



**Titre:** Stérilisation par plasma différé : compréhension et optimisation du  
Title: procédé

**Auteur:** Stéphane Moreau  
Author:

**Date:** 1999

**Type:** Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

**Référence:** Moreau, S. (1999). Stérilisation par plasma différé : compréhension et  
Citation: optimisation du procédé [Master's thesis, École Polytechnique de Montréal].  
PolyPublie. <https://publications.polymtl.ca/8820/>

 **Document en libre accès dans PolyPublie**  
Open Access document in PolyPublie

**URL de PolyPublie:** <https://publications.polymtl.ca/8820/>  
PolyPublie URL:

**Directeurs de  
recherche:**  
Advisors:

**Programme:** Unspecified  
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

STÉRILISATION PAR PLASMA DIFFÉRÉ : COMPRÉHENSION ET  
OPTIMISATION DU PROCÉDÉ

STÉPHANE MOREAU  
INSTITUT DE GÉNIE BIOMÉDICAL  
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION  
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES  
(GÉNIE BIOMÉDICAL)  
DÉCEMBRE 1999



**National Library  
of Canada**

**Acquisitions and  
Bibliographic Services**

**395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada**

**Bibliothèque nationale  
du Canada**

**Acquisitions et  
services bibliographiques**

**395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada**

*Your file Votre référence*

*Our file Notre référence*

**The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.**

**The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.**

**L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.**

**L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.**

**0-612-53592-4**

**Canada**

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé

STÉRILISATION PAR PLASMA DIFFÉRÉ : OPTIMISATION ET  
COMPRÉHENSION DU PROCÉDÉ

Présenté par : MOREAU Stéphane

En vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès Sciences Appliquées

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

M. SAVARD Pierre, Ph. D., président

M. YAHIA L'Hocine, Ph. D., membre et directeur de recherche

M. BARBEAU Jean, Ph. D., membre et codirecteur de recherche

M. MOISAN Michel, Ph. D., membre et codirecteur de recherche

Mme. TABRIZIAN Maryam, Ph. D., membre et codirectrice de recherche

M. DARBORD Jean-Christophe, Ph. D., membre

*À Chantal pour sa patience sans borne,  
À mes parents pour leur amour inconditionnel et leurs encouragements,  
À Julie, ma sœur,  
À mes ami(e)s.*

## **REMERCIEMENTS**

---

Je désire en premier lieu remercier le professeur L'Hocine Yahia de m'avoir accepté à l'intérieur de son groupe de travail et de m'avoir si bien dirigé durant ces deux années de recherche sur la stérilisation par plasma.

Au professeur Michel Moisan du Groupe de Physique des Plasmas pour sa rectitude et son honnêteté, pour ses mots d'encouragements ainsi que pour sa dévotion à ce projet. Merci M. Moisan.

Au professeur Jean Barbeau de la Faculté de Médecine Dentaire pour ses aptitudes microbiologiques, pour sa joie de vivre et son éternel sourire. Merci Jean.

Un gigantesque merci à Maryam Tabrizian qui m'a enduré pendant deux longues années. Merci Maryam de m'avoir pris sous ton aile et de m'avoir si bien orienté. Continue de transmettre tes qualités à tes étudiant(e)s, tu ne fais que les rendre meilleur(e)s. Merci Maryam.

Des mercis très spéciaux au professeur Jacques Pelletier, à Thierry Lagarde, à Michel Rohr ainsi qu'à Charles Mitzner qui ont su m'accueillir et me transmettre une partie de leur générosité comme nul ne peut le faire lors de mon séjour en France chez Metal Process. Un gros merci spécial à Michel pour sa générosité et son hospitalité.

Merci à Françoise Desor et au Colonel Dominique Vidal du Centre de Recherche des Services de Santé des Armées (La Tronche, France) pour leurs connaissances microbiologiques et leurs discours des plus intéressants.

À André Ricard du Centre de Physique Atomique de Toulouse pour les leçons sur la spectroscopie par titrage de NO. Sans cette contribution, mon travail de recherche serait de qualité moindre.

À Annie Leduc pour son incroyable patience. Annie, tu as su relever tout un défi : celui de me transformer en microbiologiste. Merci pour tout Annie.

Un merci tout spécial à messieurs François Roy et Robert Lemay pour leur assistance technique.

Gros merci à mes quatre Louise préférées. Louise Lafortune et Louise Grégoire du département de physique de l'Université de Montréal, Louise Bélanger de l'institut de génie biomédical de l'Université de Montréal et un énorme merci à Louise Clément du Groupe de Recherche en Biomécanique et Biomatériaux pour ses conseils et sa grande patience. Merci aussi à Diane Giroux pour les nombreux formulaires qui m'ont nécessité une assistance, merci Diane pour ton dévouement.

Évidemment, je ne voudrais pas passer sous silence tous mes confrères et consœurs de travail. Dans l'ordre désordonné : Fatiha Chellat, Caroline Demers, Sophie Lerouge, Isabelle Catelas, Michel Assad, Karine Julien, Benjamin Thierry, Yassine Kabouzi, Samir Ilias, Céline Campillo, Olivier Pauna et Nicolas Gonon. Merci tout spécial pour mon administrateur de réseaux préféré : Louis-Philippe Massé. Merci LP.

Mes remerciements pour Dr. Savard et Dr. Darbord qui ont gracieusement accepté de faire partie du jury.



## *RÉSUMÉ*

---

Le sujet de ce travail de recherche concerne la stérilisation par plasma en post-décharge ainsi que l'optimisation de ce nouveau procédé. Quelques mécanismes d'action de destruction des spores bactériennes par les espèces actives du plasma différé (post-décharge) sont proposés.

Le but de ce travail de recherche consistait à tenter de comprendre, par une approche expérimentale rigoureuse, les différents mécanismes permettant de tuer des spores bactériennes grâce aux diverses espèces actives formées dans une décharge électrique (plasma). De plus, diverses conditions opératoires du plasma (débit de gaz, pression, puissance transmise, température du substrat, nature de l'enceinte, géométrie du réacteur, diamètre du tube à décharge) purent être utilisées afin d'atteindre ces objectifs de destruction totale des micro-organismes. Ce projet entre donc dans le développement d'un nouveau procédé de stérilisation utilisant les espèces actives d'une post-décharge gazeuse.

Tout comme les stérilisateur commerciaux (autoclave, chaleur sèche, oxyde d'éthylène), un stérilisateur par plasma doit respecter certains critères afin de pouvoir être validé un jour par un organisme régissant les normes inhérentes à ce domaine. L'un de ces critères est l'obtention d'un niveau sécuritaire de stérilisation (de l'anglais : safety assurance level) qui signifie que sur une charge à stériliser d'un million d'objets, il y ait

moins d'un objet sur le lot qui ne soit pas stérile. Ces normes très sévères concernent une probabilité de stérilisation car il est impossible de dire qu'un objet ou qu'un lot d'objets soit stérile avec une certitude absolue. D'autres critères importants concernant l'acceptation d'un nouveau procédé de stérilisation sont : les faibles coûts d'utilisation et d'entretien, la sécurité pour les utilisateurs, les cycles rapides et surtout, un procédé utilisant de basses températures afin de pouvoir stériliser les nouveaux matériaux biomédicaux thermosensibles. Le plasma semble donc être un procédé respectant ces divers critères.

Pour l'ensemble des travaux exécutés dans ce projet, deux prototypes furent utilisés : un développé à l'Université de Montréal (surfatron) et un autre à Meylan (France) (surfatron-guide). Les deux utilisèrent la post-décharge d'un plasma ainsi que le même porte-échantillon (à quelques différences près).

Les principaux résultats dégagés de ces expériences sont très variés et ouvrent la voie à d'autres recherches complétant ainsi les résultats apportés dans ce travail. Le premier résultat important est la confirmation du rôle de l'oxygène atomique comme espèce active stérilisante. En effet, le simple ajout d'oxygène moléculaire dans un mélange gazeux augmente l'efficacité de destruction des spores bactériennes de façon drastique. De plus, ce phénomène est observé à des pourcentages aussi faibles que 5% et moins d'O<sub>2</sub>. Il est également important de mentionner que l'addition d'une aussi faible quantité d'oxygène augmente le taux de dissociation des espèces favorisant ainsi une

formation accrue d'espèces sporicides. Ensuite, la possible formation d'ozone, reconnue pour avoir d'excellentes propriétés anti-microbiennes, permet d'extrapoler sur certains mécanismes de destruction possibles des micro-organismes.

Des paramètres opératoires comme le débit et la pression de gaz à l'intérieur de l'enceinte de traitement jouent des rôles fondamentaux dans la stérilisation par plasma en post-décharge. D'après les résultats obtenus, il semblerait qu'un débit élevé soit nécessaire pour obtenir un degré de destruction approprié. Par contre, une baisse de pression permet une diffusion efficiente des espèces dans tout le volume de traitement. Cette baisse de pression permet également d'augmenter la durée de vie des espèces actives de la post-décharge en diminuant de façon considérable les collisions entre celles-ci. Le problème qui se pose alors est que lorsque le débit de gaz est augmenté, la pression augmente aussi. Le dilemme : est-ce mieux d'augmenter le débit de gaz ou de diminuer la pression? Pour l'instant, cette question demeure sans réponse. Pour y répondre, il faudrait peut-être parler de densité critique d'espèces actives atteignant les micro-organismes. Des travaux futurs élucideront éventuellement cette question.

Une autre partie importante consista en l'utilisation d'une méthode spectroscopique, le titrage par NO (oxyde nitrique), afin de quantifier les différentes espèces atomiques présentes dans l'enceinte de post-décharge. Grâce à ces mesures, il fut possible d'établir des corrélations certaines entre l'efficacité de destruction et les espèces actives inhérentes au plasma différé. Entre autres résultats, l'observation de molécules de  $\text{NO}_\beta$

a permis d'obtenir des taux de destruction très intéressants pour la continuité de ce travail de recherche. Ces molécules NO émettent dans la région ultraviolette du spectre électromagnétique. Ces mêmes photons sont extrêmement nocifs pour les espèces biologiques, d'où l'efficacité accrue du traitement. Il fut aussi montré qu'il y a synergie entre l'oxygène atomique et le rayonnement UV lors de l'élimination des spores bactériennes.

D'autres résultats montrèrent le rôle non négligeable des parois de l'enceinte de traitement. En effet, une enceinte de Pyrex donnait des résultats différents d'une enceinte de cuivre ou d'aluminium sur l'efficacité de la stérilisation. Ces différences furent attribuées aux divers mécanismes de perte des espèces activées du plasma différé sur les parois du réacteur. Ces pertes dépendaient du fini de surface, de la densité du matériau utilisé, de la stabilité des oxydes formés en surface ainsi que du procédé de fabrication.

Des essais préliminaires furent effectués sur des tubulures de 15 et 30 cm ayant des diamètres internes de 3.6 et de 4.5 mm avec des indicateurs biologiques commerciaux. La stérilisation de certains de ces échantillons fut complète laissant présager un avenir intéressant pour ce type de procédé.

## ***ABSTRACT***

---

Gas plasma, also known as the fourth state of matter, has many interesting advantages compared to other sterilization techniques. This is why a complete work has been dedicated trying to improve and optimize its operating conditions leading to the complete sterilization within short cycle time and low temperatures.

The principal aspect of this work was the development of a new gas plasma sterilization method using the flowing afterglow of a gaseous discharge. Some insights on the bacterial spores destruction mechanisms by the afterglow active species are brought.

In summary, the aim of this study was to understand, by following a rigorous experimental approach, the different mechanisms enabling one to kill bacterial spores with the species formed through an electrical discharge (gas plasma). Moreover, some of the operating conditions of the gaseous discharge (gas flow and pressure, transmitted power, substrate temperature, nature of the reactor materials, chamber geometry, discharge tube diameter, etc.) were tested in the goal of optimizing the process. This project enters in the development of a new low-temperature sterilizer using the flowing afterglow active species to sterilize contaminated samples.

Like autoclave, dry heat and ethylene oxide, gas plasma sterilizer should respect some criteria to be validated and accepted by the medical administrators. One of these limitations is to be able to obtain the safety assurance level of  $10^{-6}$ . This means that after a sterilization treatment, there is less than a chance in a million that a microorganism is still alive. These standards are probabilistic due to the impossibility to affirm whether an item is sterile or not after a given time. Other criteria leading to the acceptance of a new sterilization process are:

- 1) A short sterilization time;
- 2) A low-temperature process due to the arrival of new polymeric medical devices;
- 3) A low cost of utilization.

The first part of this project is dedicated to the history of gas plasma sterilization and how the subject has been developed and eventually commercialized by two major companies. This synthesis helps to situate our works throughout gas plasma sterilization advances.

The second article presented in this thesis concerns the optimization of the gas plasma operating conditions and their influences on the sterilization efficacy. The first results obtained showed that atomic oxygen is a key player in gas plasma afterglow sterilization. Moreover, it seems that by decreasing the gas pressure and by increasing

the gas flow, the process is optimized. This is mainly due to the better active species distribution within the treatment chamber volume.

Another important finding of this paper is the major contribution of the  $\text{NO}_\beta$  molecules formed in a 2%  $\text{O}_2$  /  $\text{N}_2$  mixture. As a matter of fact, these species emitted photons that are in the UV range of the electromagnetic spectrum. UV are well known for their bactericidal properties. Using the synergistic effect of UV emission with atomic oxygen led to very good results showing the feasibility of such a process.

The reactor wall material has been shown to be an important factor in regard of species losses throughout collisions with the walls. Spectroscopic analyses proved that using a copper or an aluminium reactor led to less oxygen species losses and therefore to a better process efficacy than by using Pyrex chamber. More studies need to be performed to complete these preliminary results concerning the active species loss mechanisms.

For now on, good results has been obtained and the process has a good potential for commercial applications.

## ***TABLES DES MATIÈRES***

---

<b><i>REMERCIEMENTS.....</i></b>	<b><i>v</i></b>
<b><i>RÉSUMÉ.....</i></b>	<b><i>viii</i></b>
<b><i>ABSTRACT.....</i></b>	<b><i>xii</i></b>
<b><i>TABLES DES MATIÈRES.....</i></b>	<b><i>xv</i></b>
<b><i>LISTE DES TABLEAUX.....</i></b>	<b><i>xxi</i></b>
<b><i>LISTE DES FIGURES.....</i></b>	<b><i>xxii</i></b>
<b><i>LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS.....</i></b>	<b><i>xxvii</i></b>
 <b><i>CHAPITRE 1 – INTRODUCTION.....</i></b>	 <b><i>I</i></b>
<b><i>1.1 Techniques actuelles.....</i></b>	<b><i>1</i></b>
1.1.1 Autoclave.....	2
1.1.2 Chaleur sèche.....	2
1.1.3 Oxyde d'éthylène.....	3
1.1.4 Irradiation gamma.....	4
1.1.5 Radiation ultraviolette.....	4
1.1.6 Glutaraldéhyde.....	4
1.1.7 Formaldéhyde.....	5
1.1.8 $\beta$ -propiolactone.....	6
1.1.9 Peroxyde d'hydrogène.....	6
1.1.10 Acide peracétique.....	7



1.2 Stérilisation vs. désinfection.....	8
1.3 Nouvelle technique.....	8
1.4 Le plasma comme alternative.....	9
1.5 Références.....	12
 <i>CHAPITRE 2 – REVUE DE SYNTHÈSE.....</i>	 <i>15</i>
2.1 Abstract.....	17
2.2 Introduction.....	18
2.3 What is a gaseous plasma.....	19
2.4 Gaseous plasma sterilization : history.....	23
2.5 Hydrogen peroxide plasma-based and peracetic acid plasma-based era.....	31
2.6 New developments.....	36
2.7 Some results concerning the flowing plasma afterglow sterilizer developed in our laboratories.....	37
2.8 Future of gaseous plasma sterilization.....	37
2.9 References.....	40
 <i>CHAPITRE 3 – OPTIMISATION DES PARAMÈTRES OPÉRATOIRES DU PLASMA DIFFÉRÉ.....</i>	 <i>45</i>
3.1 Abstract.....	47
3.2 Introduction.....	48

<b>3.3 Experimental arrangements and procedures.....</b>	<b>50</b>
3.3.1 Montréal and Grenoble apparatus and respective operating conditions.....	50
3.3.2 Test spores used and accompanying microbiological procedure....	57
3.3.2.1 Biological indicators.....	57
3.3.2.2 Bacterial spore seeding and counting through colony forming unit (CFU).....	57
<b>3.4 Results.....</b>	<b>58</b>
3.4.1 Reduced pressure operation without plasma.....	59
3.4.2 Influence of gas composition, flow and pressure.....	60
3.4.2.1 Gas pressure and flow rate starting conditions.....	60
3.4.2.2 Pure argon afterglow.....	61
3.4.2.3 Adding O <sub>2</sub> to the Ar discharge.....	63
3.4.2.4 Comparing O <sub>2</sub> /N <sub>2</sub> and O <sub>2</sub> /Ar afterglows.....	64
3.4.2.5 The UV photons, the leading species.....	65
3.4.3 Influence of the sample position in the afterglow chamber.....	67
3.4.4 Influence of the substrate temperature.....	70
<b>3.5 Discussion.....</b>	<b>71</b>
3.5.1 UV photons and oxygen atoms as the main inactivating species...	72
3.5.2 Spore inactivation mechanisms.....	72
3.5.3 Occurrence of steps in afterglow inactivation plots.....	74
3.5.4 The influence of the substrate temperature.....	76
3.5.5 Hydrodynamics of the gas flow.....	77

3.5.5 Hydrodynamics of the gas flow.....	77
<b>3.6 Conclusion.....</b>	<b>78</b>
<b>3.7 Acknowledgements.....</b>	<b>79</b>
<b>3.8 References.....</b>	<b>80</b>
 <b>CHAPITRE 4 – SPECTROSCOPIE PAR TITRAGE DE NO.....</b>	 <b>84</b>
<b>4.1 Introduction.....</b>	<b>85</b>
<b>4.2 Spectroscopie par titrage de NO : principes et résultats préliminaires...86</b>	
4.2.1 Principes généraux du titrage par NO.....	87
4.2.1.1 Dosage de l'azote atomique dans un mélange x% N <sub>2</sub> / Ar.....	88
4.2.1.2 Dosage de l'oxygène atomique dans une post-décharge x% O <sub>2</sub> /Ar.....	93
4.2.1.3 Dosage de [N] et [O] dans les mélanges x% O <sub>2</sub> / N <sub>2</sub> .....	95
<b>4.3 Titrage par no : principaux résultats appliqués à la stérilisation par plasma en post-décharge.....</b>	<b>105</b>
4.3.1 Mesure de la concentration en oxygène atomique.....	106
4.3.2 Mesure de la concentration en azote atomique.....	108
4.3.3 Émission NO <sub>β</sub> .....	109
4.3.4 Influence de l'oxygène atomique vs. le rayonnement UV de la post- décharge sur l'efficacité du procédé de stérilisation.....	111
<b>4.4 Titrage par no : principales discussions appliquées à la stérilisation par plasma en post-décharge.....</b>	<b>113</b>

<b>4.5 Titrage par no : principaux résultats pour les matériaux constituant l'enceinte de traitement.....</b>	<b>115</b>
4.5.1 Perte de l'oxygène atomique sur des parois de natures différentes... l	115
4.5.2 Perte de l'azote atomique sur des parois de natures différentes..... l	116
4.5.3 Influence des parois sur l'efficacité de la stérilisation..... l	118
<b>4.6 Références.....</b>	<b>120</b>
 <b><i>CHAPITRE 5 – DISCUSSION GÉNÉRALE.....</i></b>	<b><i>121</i></b>
<b>5.1 Mélange gazeux.....</b>	<b>122</b>
<b>5.2 Débit vs. pression de gaz.....</b>	<b>124</b>
<b>5.3 Température du substrat.....</b>	<b>126</b>
<b>5.4 Diamètre du tube à décharge.....</b>	<b>127</b>
<b>5.5 Caractérisation de la post-décharge par spectroscopie d'émission optique : titrage par NO.....</b>	<b>127</b>
5.5.1 Observations découlant de l'étude spectroscopique.....	128
<b>5.6 Nature des parois.....</b>	<b>129</b>
<b>5.7 Perspectives : essais préliminaires sur des tubulures.....</b>	<b>130</b>
 <b><i>CHAPITRE 6 – CONCLUSION GÉNÉRALE.....</i></b>	<b><i>132</i></b>

<i><b>BIBLIOGRAPHIE</b></i> .....	<i><b>134</b></i>
-----------------------------------	-------------------

## ***LISTE DES TABLEAUX***

---

<b>Tableau 2.1</b>	Summary of the features of plasma and plasma-based sterilizers.....	35
<b>Tableau 2.2</b>	Summary of the features of conventional sterilizers.....	39
<b>Tableau 3.1</b>	Operating conditions for determining the influence of the sample position in the afterglow chamber. Microwave absorbed power: 150 W.....	70

## ***LISTE DES FIGURES***

---

<b>Figure 1.1</b> Molécule d'oxyde d'éthylène.....	<b>3</b>
<b>Figure 1.2</b> Molécule de glutaraldéhyde.....	<b>5</b>
<b>Figure 1.3</b> Molécule de formaldéhyde.....	<b>5</b>
<b>Figure 1.4</b> Molécule de BPL.....	<b>6</b>
<b>Figure 1.5</b> Molécule de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	<b>7</b>
<b>Figure 1.6</b> Molécule d'acide peracétique.....	<b>7</b>
<b>Figure 2.1</b> Schematic of the first reported apparatus used for gas plasma sterilization..	<b>24</b>
<b>Figure 2.2</b> UV emission intensity from a laser-induced air gas plasma compared to a classical Hg-based germicidal lamp.....	<b>26</b>
<b>Figure 2.3</b> Singlet oxygen formation in living cells. NADP is Nicotiamide Adenine Dinucleotide Phosphate and NADPH is Nicotiamide Adenine Dinucleotide Phosphate Hydrogenase.....	<b>28</b>
<b>Figure 2.4</b> Saturating vapor pressure of hydrogen peroxide as a function of the gas phase temperature.....	<b>31</b>
<b>Figure 2.5</b> Operating time sequence of the HPPB sterilizer principles.....	<b>33</b>
<b>Figure 2.6</b> Operating time sequence of the PAPB sterilizer.....	<b>33</b>

- Figure 3.1** The sterilizer system used at Université de Montréal. 1, microwave power generator (2.45 GHz); 2, bi-directional coupler and power meter; 3, plasma source with a surfatron wave launcher (coaxial feed); 4, afterglow processing chamber; 5, sample holder; 6, capacitive membrane pressure gauge. The insert shows the bulge at the end of the discharge tube connecting to the afterglow chamber to prevent the O-ring from being damaged.....52
- Figure 3.2** Stainless steel containers for the bacterial spore suspension. The lid is used to carry the receptacle from and to the microbiology laboratory.....54
- Figure 3.3** Sample holder to accommodate four receptacles: a) top view and b) lateral view.....54
- Figure 3.4** The sterilizer system used in Grenoble. 1, microwave power generator (2.45 GHz); 2, WR-340 waveguide feed; 3, plasma source with a waveguide-surfatron wave launcher; 4, waveguide movable short-circuit; 5, fused silica discharge tube; 6, stainless steel processing chamber; 7, Pirani pressure gauge and, 8, sample holder. Note that, in this arrangement, in contrast to that of Montréal (Fig. 3.1), the gas flows perpendicularly to the spore receptacle.....56
- Figure 3.5** Number of survivors (*B. subtilis*) after having pumped down the system to 10-20 mTorr and flowing gas through it for different periods of time, the plasma source being off.....60



<b>Figure 3.6</b> Evolution of the population of spores, as a function of time, when they are submitted to a pure argon afterglow, for two different gas pressures in the sterilization chamber (receptacle at position 2).....	62
<b>Figure 3.7</b> Adding molecular oxygen to argon gas in the discharge ensures an afterglow leading to full inactivation of the spores (receptacle at position 2).....	63
<b>Figure 3.8</b> Evolution of the spore population as a function of time when sustaining the discharge in two different oxygen containing mixtures (receptacle at position 2).....	65
<b>Figure 3.9</b> Evolution of the spore population as a function of time in two different O <sub>2</sub> /N <sub>2</sub> mixtures: the mixture with 15%O <sub>2</sub> yields the highest oxygen atom concentration while the 2%O <sub>2</sub> one maximizes the NO <sub>β</sub> UV emission.....	67
<b>Figure 3.10</b> Influence of the carrier position and gas composition on the sterility of the biological indicators (BIs).....	69
<b>Figure 3.11</b> Influence of the substrate temperature on the sterilization efficacy in a pure O <sub>2</sub> afterglow. The reactor is that of Fig. 3.4.....	71
<b>Figure 3.12</b> Schematic representation of a bacterial spore with its genetic material (DNA) and protecting coats around it.....	73
<b>Figure 4.1</b> Montage spectroscopique.....	86
<b>Figure 4.2</b> Schéma illustrant l'introduction du mélange servant à faire les analyses spectroscopiques par titrage de NO.....	88

<b>Figure 4.3</b> Variation de $I_{\text{NO}_2}$ en fonction du débit de Ar-1.3% NO dans une post-décharge Ar- $\text{N}_2$ .....	91
<b>Figure 4.4</b> Variation de $I_{\text{NO}_2}$ en fonction du débit de Ar-1.3% NO dans une post-décharge Ar- $\text{O}_2$ .....	94
<b>Figure 4.5</b> Variation de $I_{\text{NO}_2}$ en fonction du débit de Ar-1.3% NO dans une post-décharge $\text{O}_2 / \text{N}_2$ .....	95
<b>Figure 4.6</b> Variation de $I_{\text{NO}_2}$ en fonction du débit de Ar-1.3% NO dans une post-décharge $\text{O}_2 / \text{N}_2$ .....	97
<b>Figure 4.7</b> Variations de l'intensité de $\text{NO}_{\text{beta}}$ en fonction du pourcentage d'oxygène dans une post-décharge $\text{O}_2 / \text{N}_2$ .....	99
<b>Figure 4.8</b> Nombre d'atomes d'oxygène et d'azote présents dans la post-décharge mesurés par la méthode de titrage de NO.....	100
<b>Figure 4.9</b> Variation du nombre d'atomes d'azote et d'oxygène en fonction du % d' $\text{O}_2$ dans une post-décharge $\text{O}_2 / \text{N}_2$ .....	103
<b>Figure 4.10</b> Spectre d'une post-décharge (2% $\text{O}_2 / \text{N}_2$ ) et identification de certaines raies de $\text{NO}_\beta$ (par exemple : 322 = $\text{NO}(0-8)$ , 340 = $\text{NO}(0-9)$ , 359 = $\text{NO}(0-10)$ , 381 = $\text{NO}(0-11)$ et 580 = $\text{N}_2(\text{B}, 11-7)$ ).....	106
<b>Figure 4.11</b> Concentration d'oxygène atomique à trois pressions différentes dans une enceinte de Pyrex pour un mélange $\text{O}_2 / \text{N}_2$ .....	107
<b>Figure 4.12</b> Concentration d'azote atomique à trois pressions différentes dans une enceinte de Pyrex pour un mélange $\text{O}_2 / \text{N}_2$ .....	108

<b>Figure 4.13</b> Intensité de l'émission de $\text{NO}_\beta$ dans un mélange $\text{O}_2 / \text{N}_2$ . Débit : 500 sccm.....	110
<b>Figure 4.14</b> Effet respectif du maximum $[\text{O}]$ (15% $\text{O}_2 / \text{N}_2$ ) et du maximum $I_{\text{UV}}$ (2% $\text{O}_2 / \text{N}_2$ ).....	112
<b>Figure 4.15</b> Structure du TDHT.....	114
<b>Figure 4.16</b> Concentration d'oxygène atomique dans des parois de traitement de natures différentes (Pyrex, aluminium et cuivre).....	116
<b>Figure 4.17</b> Concentration d'azote atomique dans des parois de traitement de natures différentes (Pyrex, aluminium et cuivre).....	117
<b>Figure 4.18</b> Effet de la nature des parois sur l'efficacité de la stérilisation.....	118
<b>Figure 5.1</b> Distribution des espèces actives de la post-décharge pour une pression donnée pour différents débits de gaz.....	125

## ***LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS***

---

A	Ampère
ADN	Acide désoxyribonucléique
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Alumine
Alu	Aluminium
Ar	Argon
ATCC	American type culture collection
bar	Unité de pression
BHI	Brain heart infusion
BIs	Biological indicators
BPL	β - Propiolactone
C	Carbone
CC	Courant continu
C-C	Liaison carbone – carbone
CA	Californie
CFCs	Chlorofluorocarbons
CFU	Colony forming unit
cm	Centimètre
cm <sup>-3</sup>	Par centimètre cube
cm <sup>3</sup> /min	Cubic centimeter per minute
CO	Monoxyde de carbone

CO <sub>2</sub>	Gaz carbonique
Cu	Cuivre
CuO	Oxyde de cuivre
DBD	Dielectric barrier discharge
DC	Direct current
DNA	Desoxiribonucleic acid
D-plot	Graphique semi-logarithmique illustrant le nombre de micro-organismes ayant survécu à un traitement visant à les détruire
D-value	Temps nécessaire à l'élimination de 90% d'une population bactérienne
erg/mm <sup>2</sup>	Unité de pression
EtO	Ethylene oxide
eV	Électron-Volt
f	Fréquence naturelle d'oscillation des atomes
f(x)	En fonction de la variable x
FDA	Food and drug administration
GHz	Gigahertz
H	Hydrogène atomique
Hg	Mercure
HPPB	Hydrogen peroxide plasma-based
H <sub>2</sub>	Hydrogène diatomique
H <sub>2</sub> O	Eau

$\text{H}_2\text{O}_2$	Peroxyde d'hydrogène
$I_x$	Intensité d'émission de l'espèce x
IL	Illinois
J	Joule
k	Constante de Boltzman
$k_x^y$	Constante de réaction de l'espèce x pour la destruction de y
K	Kelvin
$K_x$	Réponse spectrale de l'espèce x
L	Énergie d'adsorption
L/min	Litres par minute
ml	Millilitre
mm	Millimètre
$\text{mm}^2$	Millimètre carré
M	Argon, azote atomique ou moléculaire
mbar	Unité de pression (un millième de bar)
MHz	Mégahertz
mTorr	Unité de pression (un millième de Torr)
n	Densité de porteurs de charge
$n_0$	Densité de neutres
N	Azote atomique
NADP	Nicotiamine adenine dinucleotide phosphate
NADPH	Nicotiamine adenine dinucleotide phosphate hydrogen

nm	Nanomètre
NO	Oxyde nitrique
NO <sub>β</sub>	Oxyde nitrique dans le système β
NO <sub>2</sub>	Dioxyde nitrique
NO <sub>2</sub> <sup>*</sup>	Dioxyde nitrique excité
N <sub>2</sub>	Azote moléculaire
N <sub>2</sub> O	Protoxyde d'azote
O	Oxygène atomique
O <sub>2</sub>	Oxygène moléculaire
O <sub>2</sub> (a <sup>1</sup> Δ) et <sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Oxygène singulet
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Oxygène réduit
O <sub>3</sub>	Ozone
OE	Oxyde d'éthylène
PAPB	Peracetic acid plasma-based
ppm	Parties par million
Q <sub>x</sub>	Débit de l'espèce x
RF	Radiofréquence
r <sub>x</sub>	Pente de la mesure x
s	Seconde
SAL	Safety assurance level
sccm	Standard cubic centimeter per minute
T	Température

TDHT	5 – thyminyl – 5, 6 - dihydrothymine
Torr	Unité de pression
TSB	Tryptic soy broth
UV	Ultraviolet
vs.	Versus
W	Watt
X (Y)	État Y de l'atome ou de la molécule X
X (Y, Z)	État Y du niveau Z de l'atome ou de la molécule X
$\alpha$	Degré d'ionisation
$\beta$	Système vibrationnel bêta
$\mu\text{l}$	Microlitre
$\nu_r^x$	Fréquence radiative de l'espèce x
$\tau_{\text{ads}}$	Adsorption time
$\tau_{\text{des}}$	Desorption time
$1^{\text{q}}$ pos.	Système du premier positif
\$	Dollar canadien
$\geq$	Plus grand ou égal
$^{\circ}\text{C}$	Degrés Celsius
%	Pourcentage
[x]	Concentration de l'espèce x
$[x]_0$	Concentration initiale de l'espèce x



## **CHAPITRE 1 – INTRODUCTION**

---

Les nombreuses compressions budgétaires auxquelles font face les hôpitaux tant au Québec que dans le monde entier, forcent les administrateurs et les chercheurs à trouver de nouveaux moyens innovateurs afin de réduire au minimum les dépenses inhérentes au bon fonctionnement du système hospitalier. Par exemple, le budget accordé par l'Institut de Cardiologie de Montréal pour l'utilisation de cathéters est passé de 80 000 \$ (avant 1996) à plus de 1 000 000 \$ (après 1996) simplement à cause de l'interdiction de réutiliser ces derniers [1]. Cette restriction force donc les hôpitaux à utiliser les cathéters qu'une seule fois. Une restérilisation de ces derniers entraînerait une économie d'argent importante permettant ainsi d'améliorer la rapidité et l'efficacité des soins prescrits aux patients. Par contre, une restérilisation passe inévitablement par l'utilisation d'une technique de stérilisation adéquate permettant de préserver la fonctionnalité des matériaux traités. Les techniques actuelles ne permettent pas une telle restérilisation principalement à cause des différents agents physiques et chimiques utilisés pour détruire les micro-organismes indésirables.

### ***1.1 Techniques actuelles***

L'autoclave, la chaleur sèche, l'oxyde d'éthylène (OE), l'irradiation gamma, la lampe germicide (UV), le glutaraldéhyde, le formaldéhyde, la  $\beta$ -propiolactone, le peroxyde

d'hydrogène et l'acide peracétique sont parmi les méthodes les plus populaires malgré qu'elles ne soient certainement pas les plus appropriées pour certains matériaux.

### ***1.1.1 Autoclave***

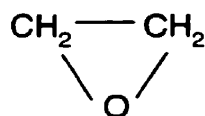
La stérilisation par la vapeur est la plus ancienne de toutes les méthodes énumérées ci-dessus. La vapeur en elle-même n'est pas toxique, peut être facilement contrôlée et est relativement peu dispendieuse. La stérilisation à la vapeur est la méthode la plus reconnue universellement sauf dans le cas de certains matériaux qui ne résistent pas aux fortes températures (121°C) et aux taux d'humidité élevés [2]. Donc, dans un contexte de restérilisation, l'autoclave n'est pas la technique la plus appropriée. De plus, environ 20% de tous les items stérilisés aux États-Unis le sont via la vapeur d'eau [3].

### ***1.1.2 Chaleur sèche***

La stérilisation par la chaleur sèche est souvent la méthode de choix pour les matériaux qui ont une importante stabilité thermique mais qui ne tolèrent pas la vapeur. Par exemple, les poudres, les liquides non visqueux, les verres et l'acier inoxydable peuvent être comptés parmi ces matériaux. Comme la chaleur sèche n'est pas corrosive pour l'acier inoxydable, c'est la méthode de choix pour les instruments coupants [4]. Par contre, cette méthode est contre-indiquée pour la restérilisation de matériaux polymériques.

### ***1.1.3 Oxyde d'éthylène***

La stérilisation par les gaz est utilisée depuis environ une quarantaine d'années [5]. Par contre, l'oxyde d'éthylène fut découvert par Wurtz en 1859 par la réaction entre une solution d'hydroxyde de potassium et la monochlorhydrine de glycol [6]. La préparation industrielle est aussi effectuée par oxydation directe de l'éthylène par l'air ou l'air enrichi en oxygène à des températures optimales allant de 260°C jusqu'à 290°C sous une pression de 10 à 30 bars et en présence de catalyseurs [7]. La première utilisation de l'oxyde d'éthylène comme agent stérilisant remonte au début des années 30 [8]. Par contre, la première utilisation pour des applications médicales remonte à la fin des années 40 [9]. À l'état gazeux, l'oxyde d'éthylène peut entraîner des irritations des muqueuses oculaires et respiratoires ainsi que des nausées, des vomissements et des troubles nerveux. De plus, une longue période d'aération ( $\geq 12$  heures) est nécessaire afin d'enlever tous les résidus toxiques s'étant adsorbés sur les surfaces stérilisées. Il est également important de mentionner que l'oxyde d'éthylène possède des propriétés cancérigènes [7]. Cette méthode, malgré ses propriétés sporicides, ne convient pas du tout aux principes de restérilisation suggérés ici principalement à cause de sa toxicité inhérente et à la tendance actuelle de vouloir complètement retirer cette technique des milieux hospitaliers. La molécule d'OE est illustrée sur la figure I.3.



**Figure I.1 :** Molécule d'oxyde d'éthylène.

#### ***1.1.4 Irradiation gamma***

Le procédé par lequel des radiations ionisantes vont tuer les micro-organismes est très efficace, surtout pour des matériaux ne tolérant pas les chaleurs importantes des autres techniques comme l'autoclave et la chaleur sèche. Par contre, les inconvénients majeurs de l'irradiation gamma sont les modifications tant volumiques que surfaciques qu'entraîne un traitement par ce procédé. En effet, une exposition prolongée des polymères au rayon gamma créera une réticulation et une scission des chaînes carbonées résultant en des modifications majeures des propriétés physico-chimiques inhérentes à ces types de matériaux [10]. Une restérilisation des matériaux polymériques par l'irradiation gamma est donc à éliminer car elle entraîne inéluctablement une dégradation précoce des biomatériaux.

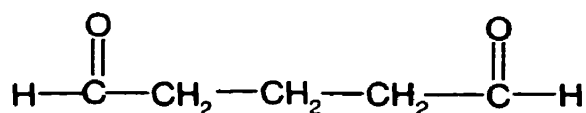
#### ***1.1.5 Radiation ultraviolette***

Tout comme les radiations ionisantes, les ultraviolets sont très efficaces pour détruire les micro-organismes [11]. Malheureusement, comme il s'agit d'une attaque directionnelle, c'est-à-dire qu'il s'agit d'un faisceau de photons se dirigeant dans une direction donnée, il est difficile de stériliser des objets de géométrie complexe principalement à cause des nombreuses zones d'ombrage apparaissant.

#### ***1.1.6 Glutaraldéhyde***

Le glutaraldéhyde (figure 1.2) est une molécule très active alkylant et inactivant les protéines. Une solution tamponnée de glutaraldéhyde à 2% est un désinfectant très

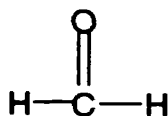
efficace qui sert à désinfecter du matériel et des équipements hospitaliers et de laboratoire. Le glutaraldéhyde désinfecte les objets en 10 minutes environ mais peut exiger jusqu'à 12 heures pour détruire  $10^6$  spores bactériennes. De plus, ce produit chimique peut entraîner des réactions cutanées importantes [11].



**Figure 1.2 :** Molécule de glutaraldéhyde.

#### ***1.1.7 Formaldéhyde***

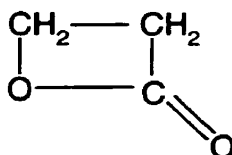
Le formaldéhyde est un gaz incolore, d'odeur très irritante, alkylant, inflammable et constituant avec l'air des mélanges explosifs (figure 1.3). Le formaldéhyde est un agent stérilisant plus puissant que le glutaraldéhyde nécessitant encore plus de précautions de la part des utilisateurs. De longs temps d'aération sont également nécessaires afin d'éviter tout danger lors d'un éventuel contact entre les tissus biologiques et les matériaux stérilisés avec cet agent [12].



**Figure 1.3 :** Molécule de formaldéhyde.

### 1.1.8 *$\beta$ -propiolactone*

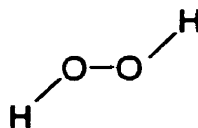
La  $\beta$ -propiolactone (BPL) (figure 1.4) est très réactive à l'égard de nombreux composés organiques et même inorganiques [13]. De plus, elle est employée occasionnellement comme gaz stérilisant. Elle a été utilisée sous forme liquide pour stériliser des vaccins et des sérums. La BPL se décompose après plusieurs heures en une forme inactive et de ce fait, elle est plus facile à éliminer que l'OE. Elle détruit également les micro-organismes plus facilement que l'OE, mais elle a un pouvoir pénétrant moins important et elle peut être cancérogène. C'est pour ces raisons que la BPL n'est pas aussi largement utilisée que l'OE [11].



**Figure 1.4 :** Molécule de BPL.

### 1.1.9 *Peroxyde d'hydrogène*

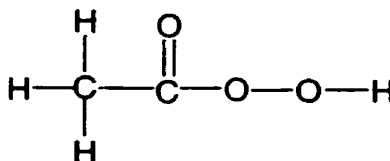
Le peroxyde d'hydrogène est utilisé dans la stérilisation de filtres et de tubes dans l'industrie alimentaire depuis environ 1916 [14].  $\text{H}_2\text{O}_2$  (figure 1.5) est plus efficace sous forme liquide que sous forme vapeur et sa concentration lors de son utilisation ne doit pas dépasser 0.1 ppm. De plus, le peroxyde d'hydrogène n'a pas un très grand pouvoir de pénétration et il est un agent très oxydant ne convenant pas aux traitements de certains matériaux polymériques et métalliques [15].



**Figure 1.5 :** Molécule de  $H_2O_2$ .

#### ***1.1.10 Acide peracétique***

L'acide peracétique (figure 1.6) est un liquide incolore d'odeur piquante, miscible à l'eau et aux solvants organiques usuels, qui explose avec violence vers  $110^{\circ}C$ . C'est un bactéricide et sporicide très efficace dont l'action est comparable à celle de l'hypochlorite de sodium car il agit comme oxydant de nombreux composés organiques et inorganiques tels que les phénols, les aldéhydes, les cétones, les amines, les composés sulfhydrylés et disulfurés. L'ensemble de ses propriétés le fait considérer comme un poison protoplasmique [16]. Encore une fois, à cause de son puissant pouvoir oxydant, cet agent de stérilisation ne convient pas à certains types de matériaux dont leurs applications médicales sont indispensables.



**Figure 1.6 :** Molécule d'acide peracétique.

### ***1.2 Stérilisation vs. désinfection***

Avant d'aller plus loin, il serait opportun de bien définir les termes suivant : stérilisation et désinfection. Ces mots sont souvent mal utilisés et pourtant, ils sont bien différents. Tout d'abord, la stérilisation est définie comme étant un processus par lequel toutes les cellules vivantes, les spores viables, les virus et les viroïdes sont soit détruits, soit éliminés d'un objet ou d'un habitat. Tandis que la désinfection est la destruction, l'inhibition ou l'élimination des micro-organismes pathogènes [17]. Il est important d'ajouter que le terme stérilisation signifie également l'obtention d'un niveau sécuritaire de stérilisation (de l'anglais Safety Assurance Level (SAL)) de  $10^{-6}$ . Ce qui implique qu'en plus d'avoir détruit au moins 1 million de spores bactériennes (ou autres micro-organismes indicateurs), qu'il y ait moins d'une chance sur un million d'avoir des survivants.

### ***1.3 Nouvelle technique***

En résumé, pour être accepté et approuvé par les différents organismes régissant le domaine de la stérilisation, une nouvelle méthode de stérilisation devra observer les critères suivant [1]:

- Procédé basse température ( $\leq 50^{\circ}\text{C}$ );
- Rapidité du cycle total de traitement;
- Efficacité du procédé (obtention du SAL de  $10^{-6}$ );



- Innocuité du procédé envers les biomatériaux;
- Sécuritaire pour les utilisateurs et les opérateurs;
- Tout ceci, à un coût raisonnable.

Le non respect de l'un des critères mentionnés ci-haut entraînera inévitablement le rejet de la méthode.

#### ***1.4 Le plasma comme alternative***

Le plasma est considéré comme étant le quatrième état de la matière, les trois autres étant, par ordre croissant d'énergie, les états solide, liquide et gazeux. Il existe divers type de plasmas : les plasmas chauds et les plasmas froids [18]. Ces plasmas peuvent se retrouver dans différents domaines d'application : astrophysique, fusion nucléaire, traitements thermiques, etc.. Il est possible de caractériser un gaz par  $\alpha$ , son degré d'ionisation :

$$\alpha = \frac{n}{n + n_o}$$

Où  $n$  est la densité des porteurs de charges,  $n_o$  est la densité de molécules (ou atomes) neutres.  $\alpha$  peut varier entre  $10^{-10}$  et 1. Généralement, lorsque  $\alpha$  est inférieur à  $10^{-4}$ , le gaz est considéré comme étant faiblement ionisé (plasma froid) et lorsque  $\alpha$  est supérieur à  $10^{-4}$ , le gaz est considéré comme étant fortement ionisé (plasma chaud) [19].

De façon générale, le plasma est un milieu ionisé actif dans lequel il est possible de retrouver des ions, des électrons, des atomes et des molécules, des radicaux libres, des photons, des atomes excités et des molécules excitées. Pour obtenir cet état de la matière, il est important d'avoir un champ électromagnétique soit oscillatoire, soit continue, tout dépendant du type du traitement demandé par l'application voulue. Normalement, une décharge électrique (plasma) prend place entre deux électrodes : l'anode et la cathode. Pour une décharge en courant continu (CC), une différence de potentiel est appliquée entre ces deux mêmes électrodes créant ainsi un champ électrique. Ce champ électrique accélérera les électrons vers l'anode et les protons, vers la cathode. Lorsque le champ appliqué sera d'une intensité suffisante, il y aura dissociation des électrons des atomes ou molécules qui seront accélérés et entreront ensuite en collision avec d'autres neutres pour les dissocier. Le phénomène se répète ainsi continuellement afin de créer le plasma ou la décharge gazeuse. Le même principe s'applique en ce qui concerne les décharges hautes fréquences (HF) sauf qu'un champ fréquentiel est appliqué au lieu d'un champ continu.

Dans les applications plasmas, il est possible de distinguer entre deux types de décharges : le plasma direct et le plasma différé (ou post-décharge). Dans le plasma direct, toutes les particules définies précédemment s'y retrouvent. Dans le plasma différé (ou en écoulement), grâce à un débit de gaz assez élevé, les particules peuvent s'échapper du champ électromagnétique et créer la zone de post-décharge du plasma. Dans cette partie, il n'y a plus de champ électromagnétique, il y a des atomes excités,

des molécules excitées, des atomes, des molécules et des photons. Les particules chargées ne sont pratiquement plus existantes à cet endroit procurant de nombreux avantages pour le traitement de surfaces sensibles dans cette zone de la décharge [20].

### *1.5 Références*

1. LEROUGE, S. (1998). Stérilisation des biomatériaux par la technologie plasma basse température : efficacité et innocuité sur les matériaux polymériques. Séminaire de Génie Biomédical, École Polytechnique de Montréal, Canada.
2. YOUNG, J.H. (1993). Sterilization with steam under pressure. Sterilization Technology : A practical guide for manufacturers and users of health care products, R.F. Morrissey & G. Briggs Phillips éd., Van Nostrand Reinhold, New York, 120-151.
3. CHAMBERLAIN, V.A. (1989). Sterility compliance issues. Sterilization in the 1990s, Health Manufacturers Association, Washington D.C., 115-128.
4. WOOD, R.T. (1993). Sterilization with dry heat. Sterilization Technology : A practical guide for manufacturers and users of health care products, R.F. Morrissey & G. Briggs Phillips éd., Van Nostrand Reinhold, New York, 81-119.
5. BURGESS, D.J. et REICH, R.R. (1993). Industrial ethylene oxide sterilization. Sterilization Technology : A practical guide for manufacturers and users of health care products, R.F. Morrissey & G. Briggs Phillips éd., Van Nostrand Reinhold, New York, 152-195.
6. WURTZ, A. (1859). Ann. Chim. Phys. (3), 53, 418-433.
7. CHAIGNEAU, M. (1977). L'oxyde d'éthylène. Stérilisation et désinfection par les gaz, Maisonneuve, France, 23-107.
8. GROSS, P.M. et DIXON, L.F. (1933). U.S. Patent 2 075 845.

9. KAYE, S. (1949). The sterilizing action of ethylene oxide. American Journal of Hygiene, 50, 289-295.
10. HERRING, C.M. et SAYLOR, M.C. (1993). Sterilization with radioisotopes. Sterilization Technology : A practical guide for manufacturers and users of health care products, R.F. Morrissey & G. Briggs Phillips éd., Van Nostrand Reinhold, New York, 196-217.
11. PRESCOTT, L., HARLEY, J.P. et KLEIN, D.A. (1995). Le contrôle des micro-organismes par les agents physiques et chimiques. Microbiologie, DeBoeck-Université, Bruxelles, 310-324.
12. CHAIGNEAU, M. (1977). Formaldéhyde. Stérilisation et désinfection par les gaz, Maisonneuve, France, 139-161.
13. CHAIGNEAU, M. (1977). Béta-propiolactone. Stérilisation et désinfection par les gaz, Maisonneuve, France, 125-138.
14. SCHUMB, W.C., SATTERFIELD, C.N. et WENTWORTH, R.L. (1955). Hydrogen peroxide, New York, Reinhold.
15. SINTIM-DAMOA, K. (1993). Other gaseous sterilization methods. Sterilization Technology : A practical guide for manufacturers and users of health care products, R.F. Morrissey & G. Briggs Phillips éd., Van Nostrand Reinhold, New York, 335-347.
16. CHAIGNEAU, M. (1977). Acide peracétique. Stérilisation et désinfection par les gaz, Maisonneuve, France, 169-171.

17. PRESCOTT, L., HARLEY, J.P. et KLEIN, D.A. (1995). Glossaire. Microbiologie, DeBoeck-Université, Bruxelles, 955-981.
18. MOISAN, M. (1996). Notes de cours. Introduction à la physique des plasmas, Université de Montréal.
19. VIDAL, D. et PELLETIER, J. (1996). Optimisation du procédé de stérilisation plasma, répondant au besoin des formations sanitaires de campagne. Rapport de fin de contrat. commande etas n°565/5034.
20. MOREAU, S., TABRIZIAN, M., BARBEAU, J., MOISAN, M. et YAHIA L'H. (1999). Gas plasma sterilization : reality vs. myth. Journal of Hospital Infection. Soumis.

## ***CHAPITRE 2 – REVUE DE SYNTHÈSE***

---

### **Article 1**

*Gas Plasma Sterilization : Past, Present and Future*

Soumis à : American Journal of Infection Control

## **GASEOUS PLASMA STERILIZATION : PAST, PRESENT AND FUTURE**

S. Moreau (B. Eng., M. Sc.), M. Moisan<sup>1</sup> (D. Sc.), M. Tabrizian (Ph. D.),

J. Barbeau<sup>2</sup> (Ph. D.) and L'H. Yahia (Ph. D.)

BBRG (Biomechanics/Biomaterials Research Group), Department of Biomedical Engineering, École Polytechnique de Montréal, 2900, boulevard Édouard-Montpetit, C.P. 6079, Succursale Centre-ville, Montréal (Qc), Canada, H3C 3A7.

1. Groupe de Physique des Plasmas, Département de physique, Université de Montréal, 2900, boulevard Édouard-Montpetit, C.P. 6128, Succursale Centre-ville, Montréal H3C 3J7, Québec.
2. Microbiology and Immunology Laboratory, Faculté de Médecine Dentaire, Université de Montréal, 2900, boulevard Édouard-Montpetit, C.P. 6128, Succursale Centre-ville, Montréal (Qc), Canada, H3C 3J7.

Correspondence should be addressed to:

Dr. Maryam Tabrizian  
Department of Biomedical Engineering  
École Polytechnique de Montréal  
2900 Boulevard Édouard-Montpetit  
C.P. 6079, Succursale Centre-Ville  
Montréal, Québec, Canada  
H3C 3A7  
Phone : (514) 340-4183  
Fax : (514) 340-4611  
E-Mail: [tabrizia@grbb.polymtl.ca](mailto:tabrizia@grbb.polymtl.ca)



## 2.1 ABSTRACT

*Objective:* The aim of this article is to review the development of gaseous plasma sterilization, paying particular attention to the role of the plasma species on the inactivation of microorganisms.

*History:* The utilization of gaseous plasma species as sterilizing agents was first reported in 1968. Since then, researchers have tried to understand and optimize this process. Many hypotheses have been proposed concerning the destruction mechanisms of the bacterial spores by the species generated by a gaseous plasma but none have led to fully satisfactory explanations. Nevertheless, promising results have already been obtained with this sterilization technique which can be very efficient besides being a new approach to microorganism inactivation.

*Commercial plasma-based sterilizers:* Commercial sterilizers calling for gaseous plasmas (Sterrad<sup>®</sup> and Plazlyte<sup>®</sup>) are already employed in medical establishments but they are actually chemical systems using a gaseous plasma as a detoxifying agent, the plasma species having no sterilizing effects. They shall be designated as plasma-based sterilizers. Plasma sterilizers are those where the plasma generated species have a sterilizing effect. They have yet to be developed and well characterized before striving for FDA approval. This paper emphasizes the difference between plasma and plasma-based sterilization.

## 2.2 INTRODUCTION

The advent of polymeric medical devices has stimulated users and developers to look for new methods to sterilize heat-sensitive materials. The most common technique used nowadays for such purpose relies on ethylene oxide (EtO). The first version of this method had to be modified because of environmental regulations on chlorofluorocarbons (CFCs) which were added to EtO to reduce its flammable properties. Although 100% EtO sterilizers, which no longer use CFCs, have been developed, there are still many questions concerning the carcinogenic properties of the residues left on the materials after processing. There are also worries about the safety of operators when opening the sterilizer before the end of the vent time, which is much longer than the actual sterilization time. Although the most common low temperature gaseous technique currently used calls for EtO, formaldehyde and glutaraldehyde which have similar noxious properties as EtO are also employed in many medical sterilization installations. Another interesting technology is the gamma irradiation process, but its implementation is costly and requires special physical installation. Moreover, gamma irradiation is well known to change the surface and bulk properties of the polymers being treated, as it breaks bonds and cross-linked chains within the volume of the material. Altogether, these various limitations have stimulated the development of new sterilization alternatives.

Ideally, such a technique should provide:

1. A sterilization time shorter or at least not longer than the actual processing time required with steam autoclave and dry heat methods (approximately 60 minutes);
2. An equal or lower processing temperature than that encountered with EtO (55°C or less);
3. The possibility of dealing with a wide range of materials and objects;
4. Harmless operation for both the operators and the materials.

The use of gaseous plasma offers an original approach to sterilization because of the intrinsic properties of the plasma medium. This method consists of exposing microorganisms to species stemming from an electrical discharge in a gas. In the pure form of this method, the gas or gases have no sporicidal effect unless they are activated by the electrical discharge. Operating conditions have to be established which yield an efficient inactivation of the bacterial spores by the gaseous plasma without altering the properties of the biomaterials submitted to the treatment [1].

### **2.3 WHAT IS A GASEOUS PLASMA**

Gaseous plasmas, also called ionized gases, can be considered as the fourth state of matter, following by order of increasing energy, the solid state, the liquid state and the gaseous state. Gaseous plasma is, by essence, a gas containing ions and free electrons. On the average, the density of electrons and ions at a given location in time is the same,

implying that the plasma is macroscopically a neutral medium. As a rule, the plasmas employed for sterilization are known as low temperature or cold plasmas (see below). In such a case, the ionized gas also comprises uncharged particles, such as atoms, free radicals and molecules, termed neutrals.

Ions as well as neutrals can be in an excited state, i.e. they can have internal energy, this energy being zero when these particles are in their ground state. Excited particles can de-excite (lose their internal energy), either spontaneously by emitting a photon or through collisions with other particles or with a surface. The collisional processes can lead to physical sputtering of the surface elements or to chemical reactions, such as oxidation, resulting in some cases in a volatile compound (pumped out) formed between the incoming atom (radical, molecule) and a surface atom; these processes can heat the surface. Photons from the excited species can also induce chemical reactions on a surface: UV photons are particularly effective in that respect. The availability of UV photons transported at a given location by a moving (excited) gas is one of the original features advocating the use of a gaseous plasma as an efficient sterilizing agent. The bactericidal and sporicidal properties derive from the combined actions of atoms, radicals and molecules with the UV photons. Such a synergetic effect is a specific property of gaseous plasma sterilization.

Man made plasmas are usually produced by submitting a gas (or gases) to an electric field, either of constant (DC field) or alternative amplitude (high frequency field), hence

their designation as electrical discharges. The E-field accelerates the charged particles, essentially the electrons since the ions are much heavier, and the field energy is ultimately communicated to the plasma through collisions of the electrons with the heavy particles.

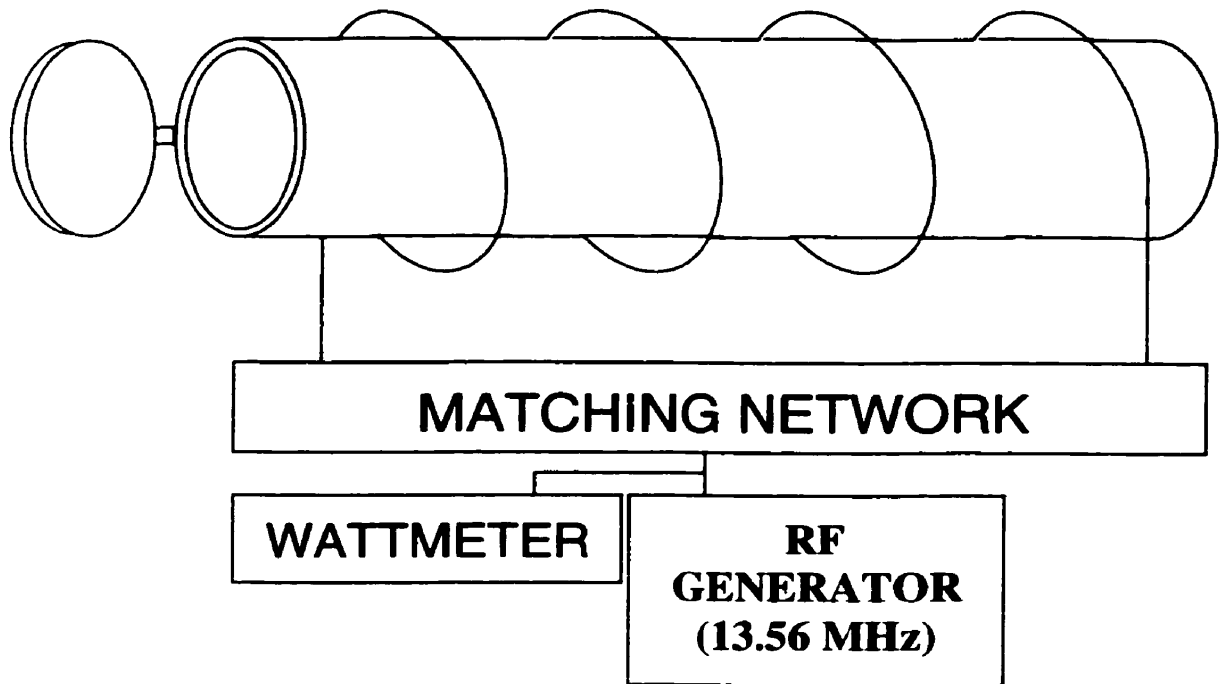
Most of the electrical discharge region is quite luminous, which is why one speaks of a glow discharge. When a gas flow is used to carry away the species produced in the glow region into an electric field-free vessel, one gets what is called an afterglow plasma or post-discharge plasma. Basically, gaseous plasma sterilization can be achieved in either the glow or the afterglow region. The afterglow contains relatively little charged particles, but is comprised of atoms, radicals and molecules, some of which are in an excited state. The main advantages of using the afterglow for sterilization purposes instead of the discharge itself can be summarized in five points: 1) with high density plasmas such as those produced by the electric field of microwaves, the gas temperature in the discharge itself is usually at least a few hundreds Celsius, whereas it can be made less than 50°C in the corresponding afterglow when using large enough gas flows, an important characteristic when dealing with heat-sensitive materials; 2) under direct plasma exposure, the treated surfaces have higher chances of being altered by the impact of charged particles which are accelerated by the plasma sheath (non-neutrality region above any surface immersed in a plasma), especially when using low frequency and radio-frequency (RF) (usually 13 and 27 MHz) sustained discharges, a phenomenon less important in microwave discharges (>300 MHz); 3) the presence of an electric field in

the processing region can induce local heating of the objects to be sterilized, hence possible damages; 4) the afterglow can fill larger chamber volumes at lower costs than glow discharges; 5) recent studies have shown that it is the neutral species, which are relatively more abundant than charged species in the discharge afterglow, that play the major role in plasma sterilization. This is an interesting intrinsic feature of the method since, as mentioned above, no damaging effects can occur from charged particles impacting on exposed devices [2].

Low charged particle density and/or low gas pressure plasmas, typically less than  $10^{12} \text{ cm}^{-3}$  and less than 10 Torr ( $\approx 10 \text{ mbar}$ ), respectively, which are those more commonly used for sterilization purposes, are known as cold plasmas. This terminology implies that these plasmas are not in thermodynamic equilibrium, which results from a higher average energy for electrons than for heavy particles. In general, cold plasmas are characterized by a mean electron energy of 1 to 10 eV ( $1 \text{ eV} = 1.6 \times 10^{-19} \text{ J}$  or 11 600 K), a gas temperature at least ten times lower and an electron density in the range of  $10^9$  to  $10^{12} \text{ cm}^{-3}$ . The lack of thermodynamic equilibrium allows gaseous plasma temperatures as low as that of room temperature to be achieved (case of Dielectric Barrier Discharge (DBD), for example) while electrons have enough energy to break the molecular bonds of microorganisms [3].

## **2.4 GASEOUS PLASMA STERILIZATION: HISTORY**

The first report on using plasma as a sterilizing agent was by Menashi [4]. The apparatus described in his paper used a pulsed RF field to achieve plasma and sterilize surfaces exposed to the discharge. Further patents by Menashi and Ashman [5], as well as by Boucher [6], Bithell [7], and Jacobs and Lin [8] suggested plasma as a viable sterilization process. All the prototypes utilized in these patents were similar: the samples to be sterilized were inserted within a cylindrical chamber filled with plasma sustained by an RF (13.56 MHz) field applied by a coil located on the outside of the dielectric chamber, as shown in Fig. 2.1. This plasma caused an important heating of the materials and, according to the authors, ensured thermal destruction of the bacterial spores or microorganisms.



**Figure 2.1 :** Schematic of the first reported apparatus used for gas plasma sterilization.

After [8].

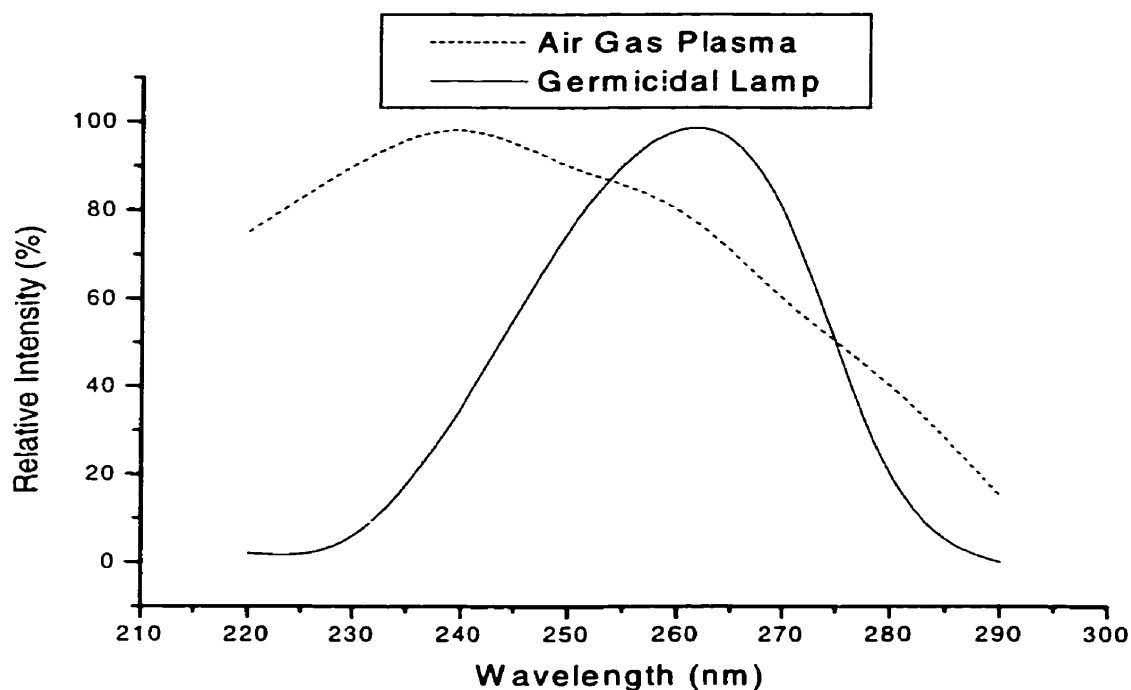
The first systems described in the scientific literature were also all made along the same lines. The objects to be sterilized were placed in a processing chamber. A gas inlet ensured the feeding of the precursor gas or gases into the chamber and a pumping duct provided removal of the byproducts. An inductive coil was used to apply the RF field from the generator into the discharge region. A wattmeter was employed to indicate the power transmitted to the gas while a matching network enabled the operator to minimize the power reflected from the RF field applicator. The first precursors were inert gases,



such as argon or helium. Later on, Boucher suggested that adding halogens such as chlorine, bromine and iodine within the sterilization chamber would increase the efficacy of the process. Boucher dismissed the possibility of turning to high pressure plasmas, which meant for him pressures larger than 1 Torr, due to a higher associated gas temperature, although use of atmospheric pressure discharges can be advantageous because of the possibility of eliminating the pumping system.

As early as 1985, Boucher focused on the role of the plasma parameters with respect to the efficacy of the process. One of his early observations was that some gases (e.g. CO<sub>2</sub>) were more efficient than others (e.g. argon) to inactivate bacterial spores. Boucher also claimed that working with humidified bacterial spores led to a more efficient process. He further concluded that the sterilization efficacy increased with the power density transmitted to the discharge for non-packaged materials [3]. At this stage of development, although very good results were obtained, plasma sterilizers were far from being commercialized, mostly because of the lack of information on the biocide mechanisms and on the effects of such a technique on the materials. A step towards a better understanding came from Peebles and Anderson (1985) who suggested that the UV emission inherent to plasmas could participate in the microorganisms' destruction [9]. Their reasoning was based on results from germicidal lamps which showed that the spores are particularly affected by UV radiation in the 200 to 300 nm range. They used a laser-induced discharge at atmospheric pressure in air to achieve a lower wavelength UV spectral band compared to a common Hg-based germicidal lamp, as shown in figure 2.2.

Integrating the area under the emission intensity curve, they found a power flux 1.86 times larger in the air plasma considered. Since a UV dose of  $1000 \text{ erg/mm}^2$  is lethal to microorganisms, they calculated that such an air plasma should be able to kill 47 decades of *B. subtilis* within only 0.2 second. This corresponds to an optimistic D-value of approximately 0.00044 second [9, 10].



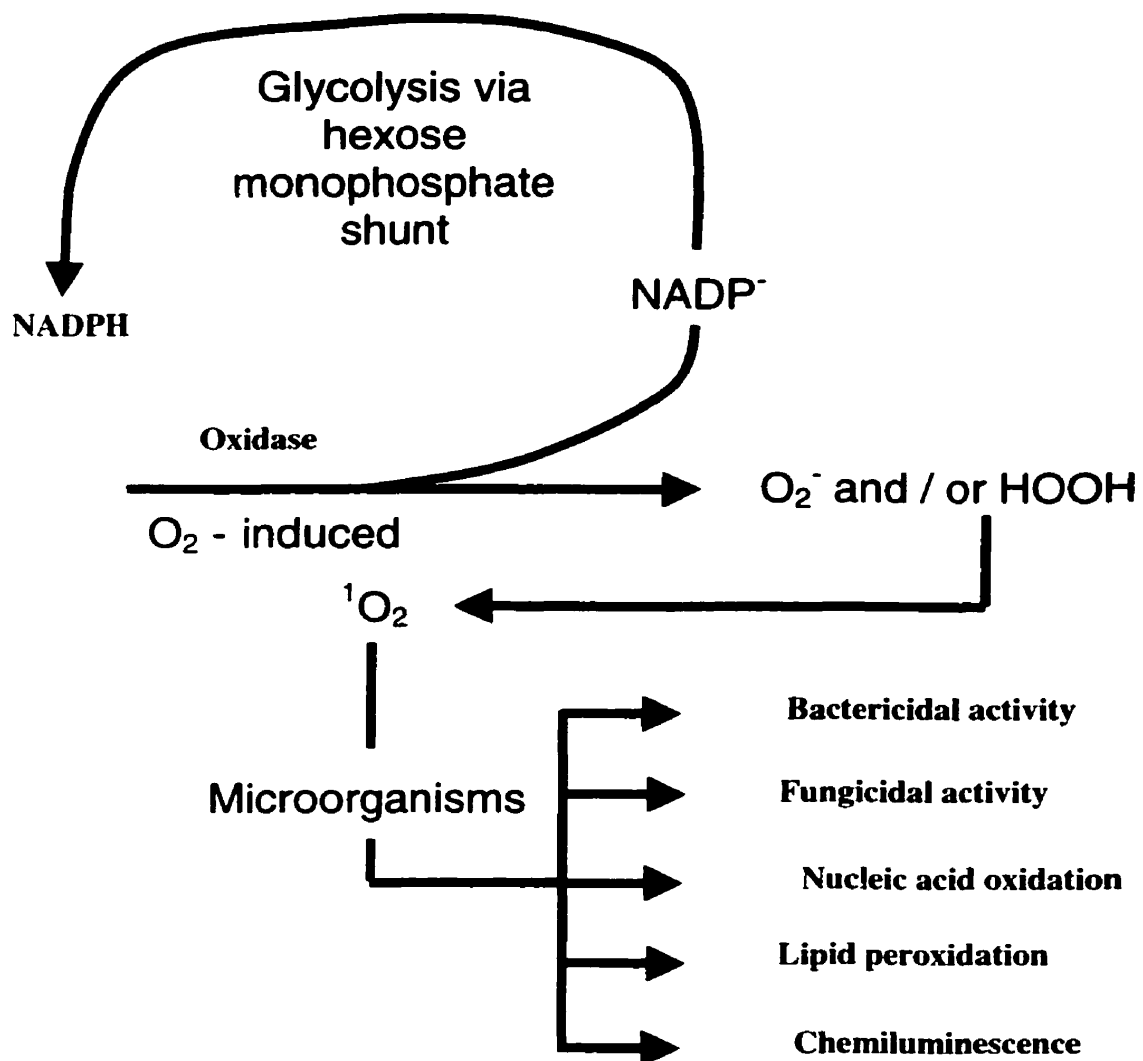
**Figure 2.2 :** UV emission intensity from a laser-induced air gas plasma compared to a classical Hg-based germicidal lamp. After [10].

From 1985 to 1989, there was no substantial progress in the understanding of the plasma destruction mechanisms of microorganisms, until Nelson and Berger showed that an  $\text{O}_2$

plasma could be very efficient as a sporicidal medium. They attributed this action to atomic oxygen, which is an electronegative species and therefore highly reactive [11]. Their conclusion should not be taken as definitive since, besides O-atoms, other oxygen-based active species such as the O<sub>2</sub> singlet state and ozone (see below) can be produced by a discharge.

The fact that the <sup>1</sup>O<sub>2</sub> singlet state (also designated as O<sub>2</sub>(a<sup>1</sup>Δ)), present under certain conditions within living cells, can lead to the death of the microorganisms means that it is an efficient bactericidal agent [12]. Figure 2.3 (from Maugh II, 1973) shows how singlet oxygen can be produced directly within the cell and what are the possible corresponding destruction pathways of the bacteria. From these mechanisms, one can easily infer that similar destruction pathways exist for the destruction of aerobic or anaerobic microorganisms by <sup>1</sup>O<sub>2</sub> molecules coming from oxygen-based gaseous plasmas.

The singlet excited molecule is a metastable energy state, which implies that its lifetime is long since it cannot emit a photon through a dipolar electric transition, a very fast ( $\approx 10^{-8}$  s) de-excitation process. In practical terms, this means that in a gaseous discharge the singlet state will de-excite essentially through collisions, possibly transferring its energy to other particles. The important point is that <sup>1</sup>O<sub>2</sub> acts as a reservoir of energy ( $\approx 1$  eV), which can then be used to activate chemical reactions in the gas phase of the plasma or on surfaces exposed to it.



**Figure 2.3 :** Singlet oxygen formation in living cells. NADP is Nicotiamide Adenine Dinucleotide Phosphate and NADPH is Nicotiamide Adenine Dinucleotide Phosphate Hydrogenase. After [12].

In the early 1990s, a series of interesting hypotheses on the inactivation mechanisms of microorganisms by a gaseous plasma began to be published. According to Nelson and Berger, the microbiocidal action of plasma should be attributed to the physical

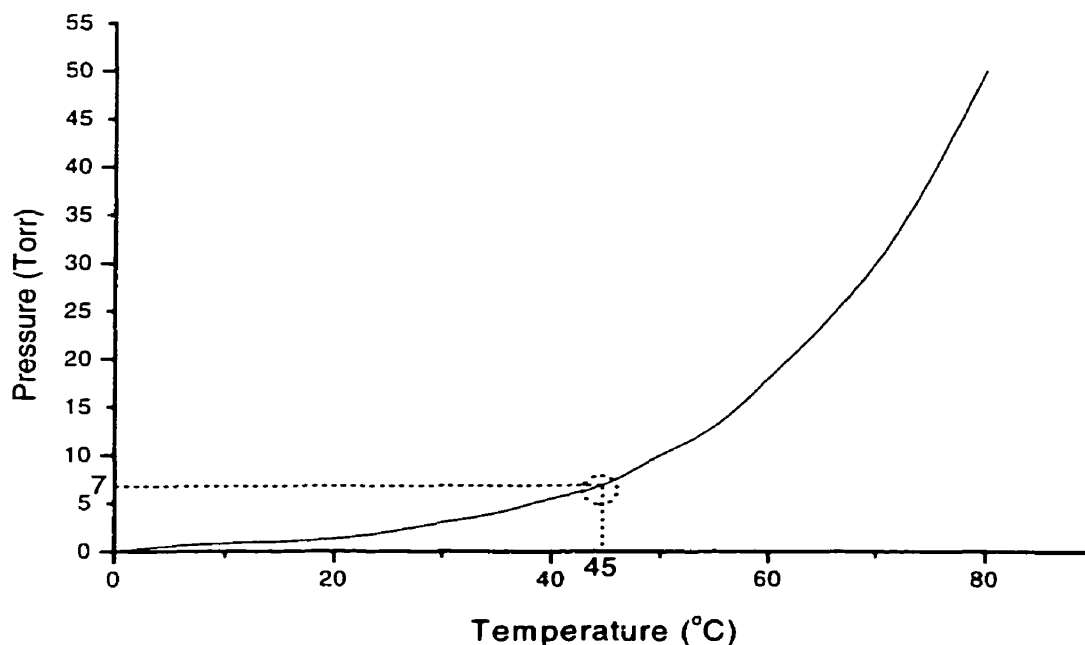
pulverization of the microorganism's membranes and to its chemical degradation caused by the UV irradiation found within the discharge [11]. Baier et *al.* in 1992 confirmed that low-pressure plasmas are very efficient for the incineration and oxidation of organic and biological substances. They also observed that gram-negative bacteria are more resistant to the process, due to their extra proteins and their lipopolysaccharide walls, and therefore require a pre-treatment to activate their surfaces, enabling higher chemical reaction kinetics, before exposure to the discharge [13].

Until then, no one had really observed or modeled quantitatively the different mechanisms taking place during a sterilization cycle. The first step in that direction came from Pelletier in 1993, who laid down equations for the slow combustion of pathogenic elements. By taking a thermodynamic approach, Pelletier improved our understanding of the combustion of the living organisms by oxygen-based gaseous plasmas. However, these equations did not take into account the UV irradiation and the other species contributions which can greatly affect the adsorption and desorption kinetics of the processes, thus leading to a better destruction rate. Pelletier was also the first to bring some insight on the influence of the substrate temperature on the combustion rate of microorganisms [14].

Other interesting points concerning the destruction mechanisms were proposed by Höller et *al.* in 1993 who pointed out that blood burden or minerals found on samples can affect in a non-negligible way the sterilization efficacy. These results forced

operators to clean their samples with demineralized water before proceeding to plasma sterilization, as it is the case with other more conventional techniques. They also proposed that the free radicals present in the discharge react with the cell walls, enzymes and nucleic acids, thereby destroying the vital functions of the microorganisms [15].

Living microorganisms are hygroscopic, which means that water vapor in the ambient gaseous phase condenses preferentially on their surfaces. In a similar way, peroxide gases like  $\text{H}_2\text{O}_2$  or oxidative gases like ozone ( $\text{O}_3$ ) can be condensed on nucleation sites such as those formed by bacteria lying on a smooth supporting surface, provided the ambient conditions (pressure and temperature) are appropriate. Viruses, like any surface heterogeneity with dimensions exceeding the critical nucleation diameter (which is approximately 1 nm), are also efficient nucleation sites [16]. This condensation mechanism is the basic principle of the plasma-based, commercial sterilizers that go through a chemical gas cycle before the glow discharge is used. There are two such systems, the hydrogen peroxide plasma-based (HPPB: Sterrad<sup>®</sup>) sterilizer and the peracetic acid plasma-based (PAPB: Plazlyte<sup>®</sup>) sterilizer where the vapor phase condenses on the bacteria or viruses and destroys them. In the HPPB device, the  $\text{H}_2\text{O}_2$  vapor must first diffuse across the packaging material. At an operating pressure of 7 Torr,  $\text{H}_2\text{O}_2$  changes to the gaseous phase at temperatures above 45°C, as shown in Fig. 2.4. The condensation of this vapor on the object to be sterilized at the location of the nucleation sites offered by the microorganisms leads to their inactivation.



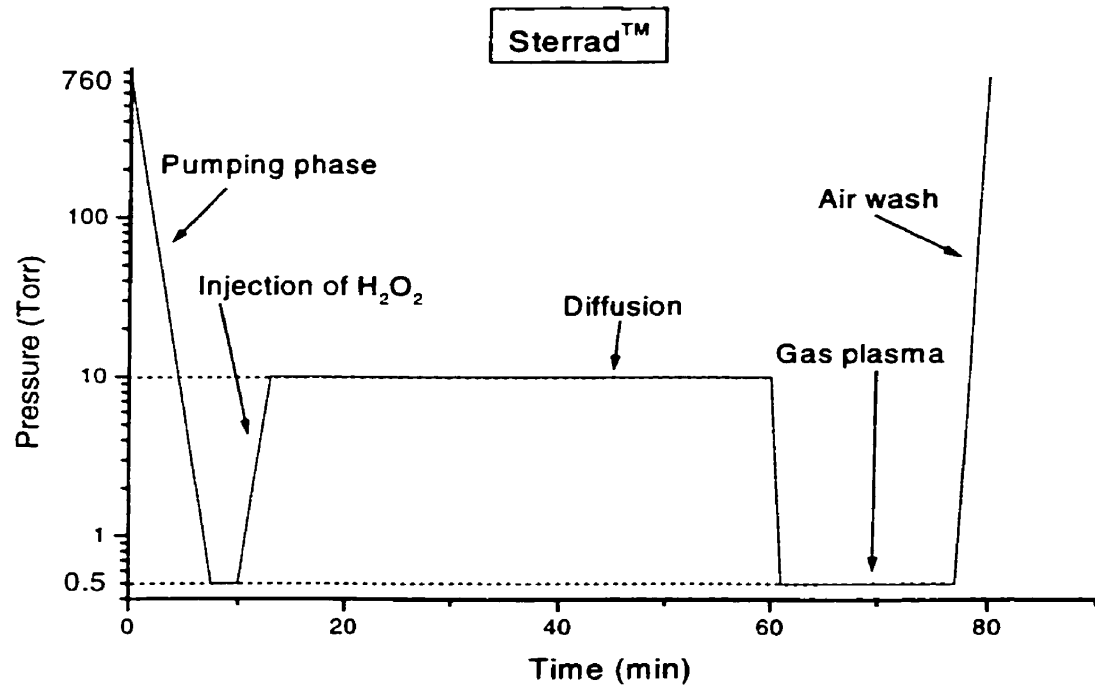
**Figure 2.4 :** Saturating vapor pressure of hydrogen peroxide as a function of the gas phase temperature. After [2].

## **2.5 HYDROGEN PEROXIDE PLASMA-BASED AND PERACETIC ACID PLASMA-BASED ERA**

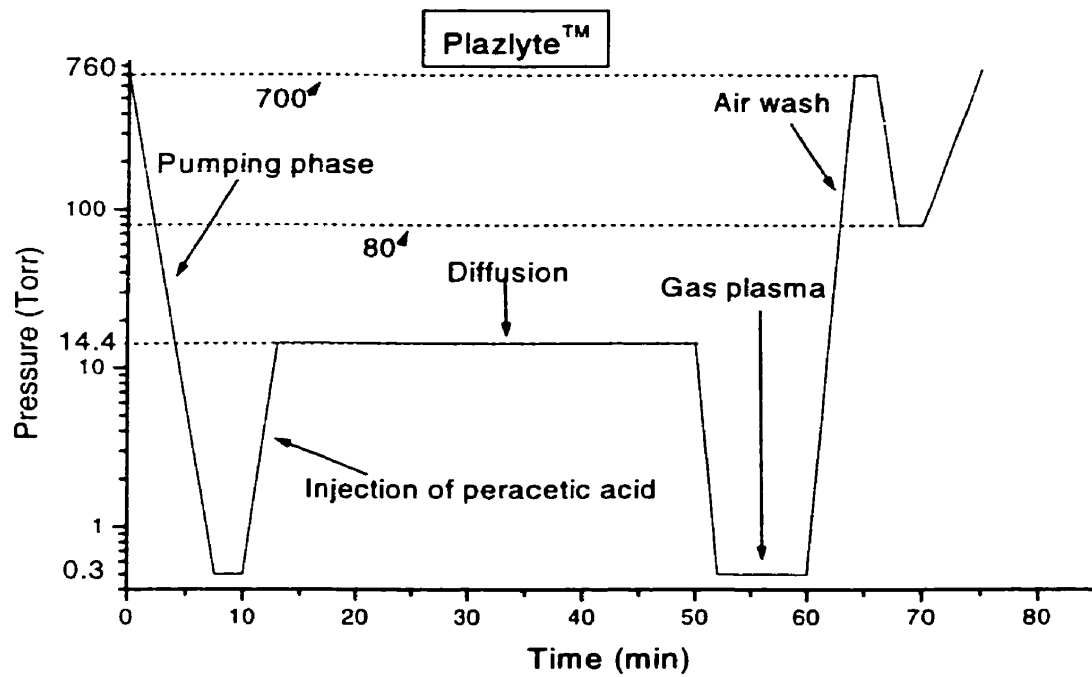
In the HPPB case, the chemical phase is provided by hydrogen peroxide (1.8 ml at a concentration of 58% vol.) while in the PAPB system, it comes from a mixture of peracetic acid (5%), hydrogen peroxide (22%), acetic acid (10%) and water (63%). In both cases, the chemical phase is followed by plasma exposure on each sterilization cycle, as shown in figures 2.5 and 2.6 [17]. The first step of the HPPB process consists in achieving a moderate vacuum (300 mTorr) in the sterilization chamber and then injecting hydrogen peroxide into the reactor, the low-base pressure ensuring good diffusion of the vapour through the packaging material towards the objects to be

sterilized. After this step, a radio-frequency electromagnetic field is switched on to create a glow discharge; this part of the process lasts from 16% to 19% of the total cycle, depending on the degree of moisture in the samples being treated. The final stage is the slow return of the chamber to the atmospheric pressure (air wash). Figure 2.6 shows a similar procedure for the PAPB system. Instead of making use of an  $H_2O_2$  plasma as in the case of HPPB, a mixture of oxygen, hydrogen and argon is utilized to create an afterglow. The entire cycle operates at a temperature of  $50^\circ C$  for both apparatus and takes 75 minutes in the case of HPPB and 60 minutes with PAPB [18]. Recent studies have shown that the plasma phase is only instrumental in stopping the oxidation effect of the chemical phase and also in removing noxious residues created by the chemical reactions between the sterilant and the materials. In both set-ups, it is the chemical (liquid) phase that provides the sterilizing action [17]. This is why, in our opinion, these systems are unduly referred to as gaseous plasma sterilizers, which does not change the fact that they can achieve complete sterilization of the biomaterials being treated, as reported by many studies [19-25].





**Figure 2.5 :** Operating time sequence of the HPPB sterilizer principles. After[20].



**Figure 2.6 :** Operating time sequence of the PAPB sterilizer. After [19].

A new technology has a chance of being adopted provided its operation costs are not higher than those of existing technologies, even when it yields substantial non-economic advantages such as less residues and a better environmental compatibility. HPPB sterilization system proved to be more cost-effective and safer than ethylene oxide sterilization because of a relatively shorter processing time and the absence of the need for aeration afterwards [26]. However, each sterilizer has its limitations. The main one for HPPB is that it cannot adequately process partially closed metal trays since the walls of the tray may shield its contents from the discharge electric field, and therefore  $H_2O_2$  residues cannot be removed by the discharge. In the case of PAPB sterilizer, the FDA issued a nationwide warning against its use for ophthalmic devices that may contain brass, zinc or copper. The problem appears to be the formation of toxic salts from the chemical sterilants when the device is used on surgical tools made of the above materials [27]. Table 2.1 summarizes the respective features and limitations of two plasma-based sterilizers and of the genuine plasma sterilizer developed by us.

**Table 2.1** : Summary of the features of plasma and plasma-based sterilizers.

Techniques	Chemical Sterilant	Discharge type	Advantages	Drawbacks
<i>HPPB</i>	Hydrogen peroxide	Radio-frequency (RF) glow discharge	Fast, no noxious residues, no aeration needed	Polymer oxidation, expensive, no data available on possible damages to materials
<i>PAPB</i>	Peracetic acid-based mixture	Microwave afterglow discharge	Fast, cycle can be chosen based on materials being treated, low cost	Polymer oxidation, environmental impact, not possible to sterilize lumens, noxious residues can be present
<i>Our Prototype</i>	None	Microwave afterglow discharge, role of UV emitters	No chemical sterilant, no noxious residues, fast, low cost, no environmental impact	Under development, more research needed to evaluate innocuity and efficacy

## 2.6 NEW DEVELOPMENTS

Many recent studies have demonstrated the efficacy of full plasma sterilization as a viable process, trying at the same time to get a hold of the basic mechanisms of such a process. For example, Chau et al., who have been working with N<sub>2</sub>O microwave sustained plasmas on some species such as *E. Coli*, *P. vulgaris*, *P. fluorescens* and *B. stearothermophilus*, suggested (without substantiating this assumption) that the inactivation mechanism results from the synergetic effect of atomic oxygen and UV photons coming from direct exposure to the plasma [28]. The study performed by Gogolewski et al. has shown that neither nitrogen and argon nor oxygen and carbon dioxide modified the mechanical properties and the molecular stability of some polymers, confirming that plasma sterilization can, under adequate conditions, ensure integrity of the materials [29]. A significant advance in plasma sterilization technologies was made by Kelly-Wintenberg et al. who reported, using a DBD-like system, that plasma sterilization can be achieved at room temperature and atmospheric pressure on many microorganisms, from *S. aureus* to bacterial spores in a uniform radio-frequency glow discharge plasma. This work also underlined the essential inactivation role of the oxidizing compounds formed in their air discharge and suggested possible routes for the destruction of a wide variety of microorganisms [30]. The comprehensive paper published by Hury et al. focuses on the role of atomic oxygen on different types of bacterial spores and compares their resistance to the plasma active species. Their article is the first to examine and, at the same time, model the influence of the substrate

temperature on the plasma sterilization efficacy, thereby projecting some light on the destruction mechanisms [31].

## **2.7 SOME RESULTS CONCERNING THE FLOWING PLASMA AFTERGLOW STERILIZER DEVELOPED IN OUR LABORATORIES**

Our research group has been focusing on the development of a new plasma sterilization system which uses the flowing afterglow of a gaseous discharge to achieve complete sterilization of the samples being treated. A safety assurance level (SAL) of  $10^{-6}$  has been achieved within 40 minutes of treatment in a yet non optimized system. We have confirmed the synergetic actions of atomic oxygen and UV emitters, using a 2% O<sub>2</sub> / 98% N<sub>2</sub> gas mixture with a flow rate  $\geq 500$  standard cm<sup>3</sup>/min, using a 100 W microwave discharge at 2.45 GHz [32].

## **2.8 FUTURE OF GASEOUS PLASMA STERILIZATION**

Gaseous plasma sterilization is a very promising alternative technique to steam autoclave, dry heat and EtO systems; the properties of these classical sterilizers are summarized in Table 2.2. Although the HPPB and PAPB are efficient and operate nicely, they are not full plasma systems. There actually exists prototypes of a new generation of sterilizers which use only a plasma as the sterilizing agent, such as the one developed in our laboratory. It is worth noting that the actual mechanisms of microorganism destruction may vary depending on the discharge operating conditions, which include the nature and pressure of the gas and the use of either a glow or

afterglow discharge. Clearly, working at atmospheric pressure where the mean free path of excited species is much less than 1 mm is different than operating in the 1 Torr range where the active species can travel over a few millimeters before losing their sporicidal properties. Atmospheric pressure operation yields much higher concentrations of active species, hence a faster processing time, but the items to be sterilized must be in closer contact with the discharge than in a reduced pressure system. The afterglow method benefits from such a reduced pressure operation while also enabling one to process large loads of medical devices of various shapes at lower costs than when using direct plasma exposure.

Other possibilities are also open, as shown by a recently patented system [33], which consists in a separate H<sub>2</sub>O plasma sterilizer (82°C) and a steam autoclave in the same apparatus, the type of materials to be processed determining the sterilizing technique used [33]. This innovation may result in a new approach to low-temperature sterilization techniques.

**Table 2.2 : Summary of the features of conventional sterilizers.**

Techniques	Advantages	Drawbacks
<i>Dry Heat and Steam Autoclave</i>	Practical, low cost, fast	High temperatures, polymer alterations, corrosion
<i>EtO and Other Mixtures</i>	Low temperatures, efficient, low cost, good penetration	Toxic, environmental impact, long aeration time needed, noxious residues, polymer alterations
<i>Chemical Liquids (formaldehyde, glutaraldehyde, etc.)</i>	Simple and practical technique, low cost	Low material penetration compared to gaseous methods, oxidative effect, noxious residues, long aeration time needed, corrosion, mechanical property modifications
<i>Gamma Irradiation</i>	Low temperatures, fast	Expensive, not recommended for hospitals, polymer alterations and degradation, cumulative effects

## 2.9 REFERENCES

1. ANDERSON, D.C. (1989). Gas Plasma Sterilization: Innovation in Practice. Navy Medicine, September – October.
2. VIDAL, D. and PELLETIER, J. (1996). Optimisation du Procédé de Stérilisation Plasma, Répondant au Besoin des Formations Sanitaires de Campagne. Rapport de Fin de Contrat Commande Etas no 565/5034.
3. BOUCHER, R.M.G. (1985). State of the Art in Gas Plasma Sterilization. Medical Device & Diagnostic Industry, 7 : 51-56.
4. MENASHI, W.P. (1968). Treatment of Surfaces. U.S. Pat. 3,383,163, May 14.
5. ASHMAN, L.E. and MENASHI, W.P. (1972). Treatment of Surfaces with Low Pressure Plasmas. U.S. Pat. 3,701,628, October 31.
6. BOUCHER, R.M.G. (1980). Seeded, Gas Plasma Sterilization Method. U.S. Pat. 4,207,286, June 10.
7. BITHELL, R.M. (1982). Package and Sterilizing Process for Same. U.S. Pat. 4,321,232, March 23.
8. JACOBS, P.T. and LIN, S.M. (1987). Hydrogen Peroxide Sterilization System. European Patent Application 207, 417, January 7.
9. PEEPLES, R.E. and ANDERSON, N.R. (1985). Microwave Coupled Plasma Sterilization and Depyrogenation I. Mechanisms of Action. Journal of Parenteral Science and Technology, 39 : 1, 2-8.



10. PEEPLES, R.E. and ANDERSON, N.R. (1985). Microwave Coupled Plasma Sterilization and Depyrogenation II. Mechanisms of Action. Journal of Parenteral Science and Technology, 39 : 1, 9-14.
11. NELSON, C.L. and BERGER, T.J. (1989). Inactivation of Micro-organisms by Oxygen Gas Plasma. Current Microbiology, 18, 275-276.
12. MAUGH II, T. (1973). Singlet Oxygen : A Unique Microbicidal Agent in Cells. Science, 182, 44-45.
13. BAIER, R.E., CARTER, J.M., SORENSEN, S.E., MEYER, A.E., MCGOWAN, B.D. and KASPRZAK, S.A. (1992). Radiofrequency Gas Plasma (Glow Discharge) Disinfection of Dental Operative Instruments, Including Handpieces. Journal of Oral Implantology, 18 : 3, 236-242.
14. PELLETIER, J. (1993). La Stérilisation par le Procédé Plasma. Agressologie, 33 : 2, 105-110.
15. HÖLLER, C., MARTINY, H., CHRISTIANSEN, B., RÜDEN, H. and GUNDERMANN, K.O. (1993). The Efficacy of Low Temperature Plasma (LTP) Sterilization, a New Sterilization Technique. Zbl. Hyg., 194, 380-391.
16. BEYSENS, D. and MARCOS MARTIN, M. (1995). Buée bactéricide. Pour la science, 210, 30.
17. KREBS, M.C., BÉCASSE, P., VERJAT, D. and DARBORD, J.C. (1998). Gas – Plasma Sterilization : Relative Efficacy of the Hydrogen Peroxide Phase Compared With That of the Plasma Phase. International Journal of Pharmaceutics, 160, 75-81.

18. ABTOX (1993). Users Guide.
19. JACOBS, P. and KOWATSCH, R. (1993). Sterrad® Sterilization System: A New Technology for Instrument Sterilization. Endoscopic Surgery, 1, 57-58.
20. CROW, S. and SMITH, J.H. (1995). Gas Plasma Sterilization – Application of Space-Age Technology. Infection Control and Hospital Epidemiology, 16 : 8, 483-487.
21. KYI, M.S., HOLTON, J. and RIDGWAY, G.L. (1995). Assessment of the Efficacy of a Low Temperature Hydrogen Peroxide Gas Plasma Sterilization System. Journal of Hospital Infection, 31, 275-284.
22. ALFA, M.J., DeGAGNE, P., OLSON, N. and PUCHALSKI, T. (1996). Comparison of Ion Plasma, Vaporized Hydrogen Peroxide, and 100% Ethylene Oxide Sterilizers to the 12/88 Ethylene Oxide Gas Sterilizer. Infection Control and Hospital Epidemiology, 17 : 2, 92-100.
23. BORNEFF-LIPP, M., OKPARA, J., BODENDORF, M. and SONNTAG, H.G. (1997). Validation of Low-Temperature-Plasma (LTP) Sterilization Systems – Comparison of Two Technical Versions, the Sterrad™ 100, 1.8 and the 100 S. Hygiene and Microbiology, 3, 21-28.
24. VASSAL, S., FAVENNEC, L., BALLEET, J.J. and BRASSEUR, P. (1998). Hydrogen Peroxide Gas Plasma Sterilization is Effective Against *Cryptosporidium parvum* oocysts. American Journal of Infection Control, 26 : 2, 136-138.
25. VICKERY, K., DEVA, A.K., ZOU, J., KUMARADEVA, P., BISSETT, L. and COSSART, Y.E. (1999). Inactivation of Duck Hepatitis B Virus by a Hydrogen

- Peroxide Gas Plasma Sterilization System : Laboratory "in use" Testing. Journal of Hospital Infection, 41, 317-322.
26. ADLER, S., SCHERRER, M. and DASCHNER, F.D. (1998). Costs of Low-Temperature Plasma Sterilization Compared with Other Sterilization Methods. Journal of Hospital Infection, 40, 125-134.
  27. <http://www.fda.gov/bbs/topics/ANSWERS/ANS00860.html>.
  28. CHAU, T.T., KAO, K.C., BLANK, G. and MADRID, F. (1996). Microwave Plasmas for Low-Temperature Dry Sterilization, Biomaterials, 17, 1273-1277.
  29. GOGOLEWSKI, S., MAINIL-VARLET, P. and DILLON, J.G. (1996). Sterility, Mechanical Properties, and Molecular Stability of Polylactide Internal-Fixation Devices Treated with Low-Temperature Plasmas. Journal of Biomedical Materials Research, 32, 227-235.
  30. KELLY-WINTENBERG, K., MONTIE, T.C., BRICKMAN, C., ROTH, J.R., CARR, A.K., SORGE, K., WADSWORTH, L. and TSAI, P.P.Y. (1998). Room Temperature Sterilization of Surfaces and Fabrics with One Atmosphere Uniform Glow Discharge Plasma, Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 20, 69-74.
  31. HURY, S., VIDAL, D.R., DESOR, F., PELLETIER, J. and LAGARDE, T. (1998). A Parametric Study of the Destruction Efficiency of Bacillus spores in Low Pressure Oxygen-Based Plasmas, Letters in Applied Microbiology, 26, 417-421.

32. MOREAU, S., TABRIZIAN, M., MOISAN, M., BARBEAU, J. and YAHIA, L'H.  
(1999). The Role of Atomic Oxygen and UV Emission in Gas Plasma Afterglow Sterilization. 18<sup>th</sup> Annual Meeting of the Canadian Biomaterials Society, Québec, June.
33. MARTENS, P.A. and RAINWATER, D.L. (1998). Plasma Water Vapor Sterilizer Apparatus. U.S. Patent 5,753,196, May 19.

***CHAPITRE 3 – OPTIMISATION DES PARAMÈTRES OPÉRATOIRES  
DU PLASMA DIFFÉRÉ***

---

**Article 2**

*Using a Plasma Flowing Afterglow to Inactivate Bacillus subtilis Spores : Influence of  
the Operating Conditions*

Soumis à : Journal of Applied Physics

**USING A PLASMA FLOWING AFTERGLOW TO INACTIVATE *Bacillus subtilis* SPORES : INFLUENCE OF THE OPERATING CONDITIONS**

S. Moreau, M. Moisan,<sup>a),b)</sup> M. Tabrizian, J. Barbeau,<sup>c)</sup> J. Pelletier<sup>d)</sup>, A. Ricard<sup>e)</sup>, and L'H. Yahia

*Biomechanics/Biomaterials Research Group (BBRG), Département de Génie Biomédical, École Polytechnique de Montréal, C.P. 6079, Succursale Centre-ville, Montréal H3C 3J7, Québec, Canada.*

<sup>a)</sup> Electronic mail: moisan@ere.umontreal.ca

<sup>b)</sup> Groupe de Physique des Plasmas, Département de Physique, Université de Montréal, C.P. 6128, Succursale Centre-ville, Montréal H3C 3J7, Québec.

<sup>c)</sup> Microbiology and Immunology Laboratory, Faculté de Médecine Dentaire, Université de Montréal, C.P. 6128, Succursale Centre-ville, Montréal H3C 3J7, Québec, Canada.

<sup>d)</sup> Centre National de la Recherche Scientifique and Laboratoire d'Électrostatique et de Matériaux Diélectriques, Université Joseph-Fourier, B.P. 166, 38042-Grenoble Cedex 9, France.

<sup>e)</sup> Centre de Physique Atomique de Toulouse (CPAT), Université Paul Sabatier, 31062-Toulouse, France.

### 3.1 ABSTRACT

The flowing afterglow of a microwave discharge can be used to efficiently inactivate bacterial spores. We have conducted a parametric study of the operating conditions of such a system, which shows that the species participating in the killing of spores are oxygen atoms and UV photons. These oxygen atoms and the excited atoms and molecules emitting the photons are carried by the flowing afterglow, and therefore made available throughout the sterilization chamber. Typical operating conditions are: 2%O<sub>2</sub>/98%N<sub>2</sub> gas mixture, 1-7 Torr pressure range and 0.5-3 standard liters/min gas flow. Total inactivation of 10<sup>6</sup> *B. subtilis* spores is achieved within 40 minutes with 100 W absorbed microwave power, at afterglow gas temperatures not exceeding 50°C, a feature of interest for heat-sensitive medical devices. The present scheme is based on the gas flow reaching all parts of the objects to be sterilized and the active species, because of their limited lifetime, being transported at the required location sufficiently rapidly. Under our operating conditions, it is the UV emission intensity that sets the sterilization time as there is always more than sufficient oxygen atoms available for the process.

### 3.2 INTRODUCTION

In the last few years, sterilization processes in hospitals have been the object of numerous controversies due to the advent of materials, essentially polymer-based, that are heat-sensitive. Gaseous plasma sterilization shows promising results with respect to these issues due to its efficacy at low temperature. However, very little is known about the destruction mechanisms of microorganisms by plasma-activated species and, furthermore, most of these systems have not been investigated systematically [1]. The aim of our article is to provide some insight as to the species participating in the inactivation process by conducting a parametric study of the operating conditions of the plasma afterglow sterilizer designed in our laboratories [2].

The use of plasma produced species as sterilizing agents was first reported in 1968 [3]. For many people, the interest in plasma sterilizing systems came from the existence of commercial devices bearing the name “plasma sterilizers” (Sterrad<sup>®</sup> (1992) from Johnson & Johnson (Irvine, CA) and Plazlyte<sup>®</sup> (1993) from Abtox (Mundelein, IL)). However, as we later found out after others, in these commercial systems the plasma has no bactericidal action, but is there to serve as a detoxifying agent by removing noxious residues and limiting the oxidation effect of the highly reactive chemical elements (hydrogen peroxide and peracetic acid-based mixture, for example) injected in the form of vapors as the sterilizing agent [4]. We therefore decided to call these systems plasma-based sterilizers, keeping the designation plasma sterilizers for those where the



inactivation of microorganisms stems from the species produced by an electrical discharge in a gas that is, otherwise, without any bactericidal action.

The use of plasmas with a low gas temperature, typically less than 50°C, offers an appropriate alternative for the sterilization of new heat-sensitive medical devices like endoscopes and catheters [5]. Such a low gas temperature can be obtained either in a very low current discharge or in a pulsed discharge such as the Dielectric Barrier Discharge (DBD), or in the flowing afterglow of even dense plasmas [1]. Our system uses the flowing afterglow of a microwave discharge sustained at 2.45 GHz, although we know that faster processing times can be obtained when the objects to be sterilized are directly exposed to the plasma. The advantages of calling for the afterglow, besides a low gas temperature (ensured by a high enough gas flow), can be summarized through the following points: 1) under direct plasma exposure, in contrast to what happens within the afterglow where the charged particle density is much lower, the treated surfaces can be altered by the impact of the charged particles accelerated within the plasma sheath, especially when using low frequency and RF sustained discharges (this effect is less important with microwave discharges); 2) the electric field of the discharge can induce local heating in non-dielectric devices, hence possible thermal damages to them; metallic objects can also shield some parts of the device to be sterilized from the E-field, hence from the plasma, and therefore prevent sterilization of their surfaces; 3) the afterglow can be made to fill large chamber volumes at lower costs than glow discharges; 4) since recent studies have shown that it is the neutral species that play the

major role in plasma sterilization, there is no essential need to operate in the discharge itself [6]. At any rate, both the plasma and afterglow methods have specific limitations, for example, as far as the shape of the devices to be sterilized and their positions in the sterilizing chamber are concerned. Clearly, when using the flowing afterglow technique, one must ensure that enough active species flow toward all part of the devices everywhere in the chamber [7].

### **3.3 EXPERIMENTAL ARRANGEMENTS AND PROCEDURES**

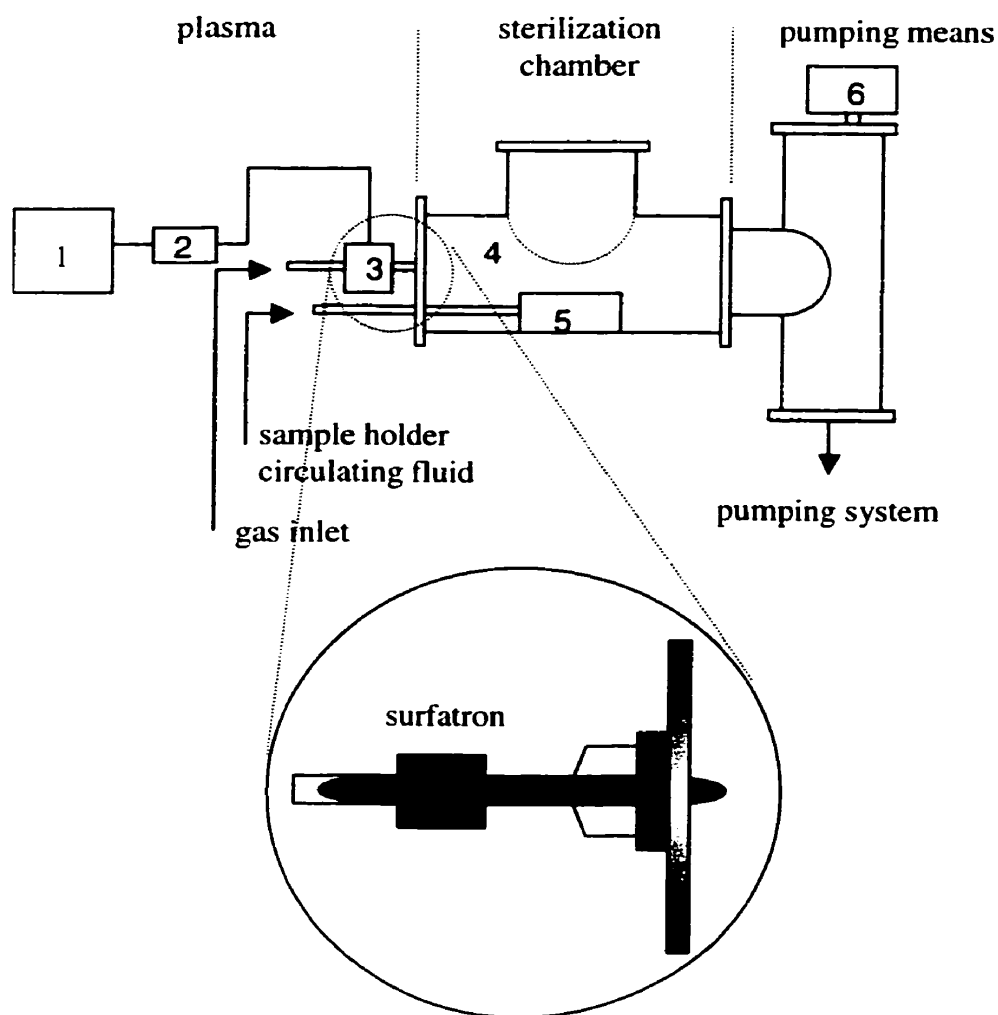
Two different sterilizer systems were put up, one at Université de Montréal and the other at the company Metal Process in Grenoble.

#### *3.3.1 Montréal and Grenoble apparatus and respective operating conditions*

Figure 3.1 shows the plasma sterilizer designed and tested at Université de Montréal. It comprises three essential parts : the plasma source, the afterglow chamber where the objects to be sterilized are placed, and a vacuum pumping system which can be adjusted to ensure the required gas flow at the required pressure in the chamber.

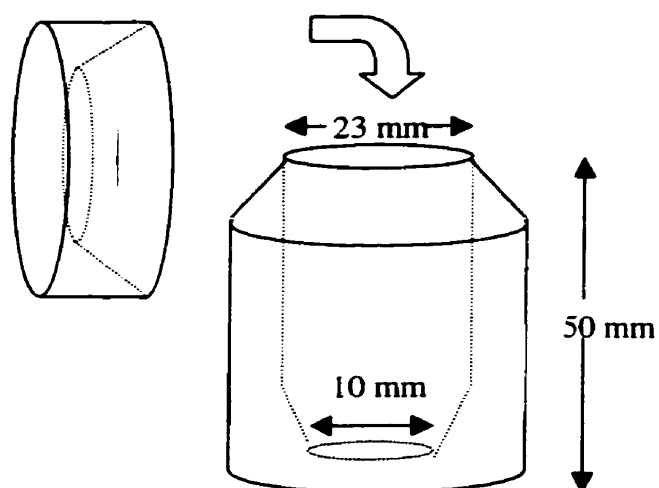
The plasma is provided by a surface-wave sustained discharge operated at 2.45 GHz, using a microwave generator with a maximum power of 180 W and a coaxial line feed. The wave launcher is a classical surfatron with its intrinsic impedance tuning means (capacitive coupler and movable plunger) [8, 9]. The incident and reflected powers are measured using a bi-directional coupler and a power meter. The surfatron is always

tuned for zero reflected power. The discharge tube of inner and outer diameters 8 and 10 mm and length 300 mm is made of fused silica. Its extremity connecting to the reactor chamber of diameter 220 mm is terminated with a bulge of diameter 30 mm (see insert in Fig. 3.1) to prevent the plasma and the microwaves from heating the sealing O-ring. As a rule, surface-wave discharges provide high density plasmas under efficient, stable and perfectly reproducible conditions [10]. Nonetheless, any other plasma source, preferably electrodeless to minimize contamination, could be employed to supply the afterglow chamber. All the gases used are introduced directly into the discharge tube, at flow rates set by calibrated mass flow meters.

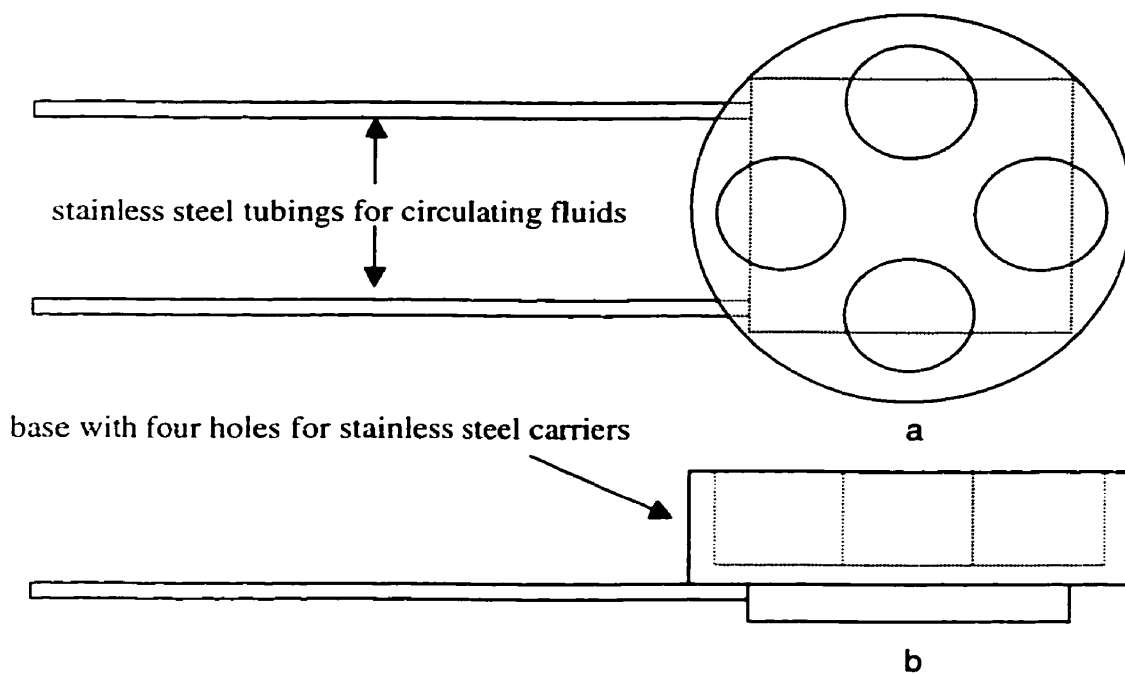


**Figure 3.1 :** The sterilizer system used at Université de Montréal. 1, microwave power generator (2.45 GHz); 2, bi-directional coupler and power meter; 3, plasma source with a surfatron wave launcher (coaxial feed); 4, afterglow processing chamber; 5, sample holder; 6, capacitive membrane pressure gauge. The insert shows the bulge at the end of the discharge tube connecting to the afterglow chamber to prevent the O-ring from being damaged.

The reactor chamber is in the form of an inverted T with cylindrical members of 220 mm diameter and it is 300 mm long, for a total volume of 20 liters. It is made of Pyrex while the flanges are made from aluminum. The biological samples are placed in stainless steel receptacles such as shown in Fig. 3.2, terminating at the bottom on a flat surface of slightly reduced diameter. These containers were designed to make it easier for the operator to collect the microorganisms left after exposure to the afterglow and to further “clean” them prior to another experiment [11]. Four such receptacles fit (thermally) tightly into corresponding holes in the substrate holder (Fig. 3.3) made of brass and they protrude above its surface by 15 mm. A temperature-controlled fluid can circulate through stainless tubing, as sketched in Fig. 3.3, to maintain the substrate holder at a fixed temperature. Using 4 containers at the same time enables us to determine the influence of the sample position with respect to the gas flow in the chamber. Stainless steel lids are used to close each of these vessels when carrying them from and to the microbiology laboratory.



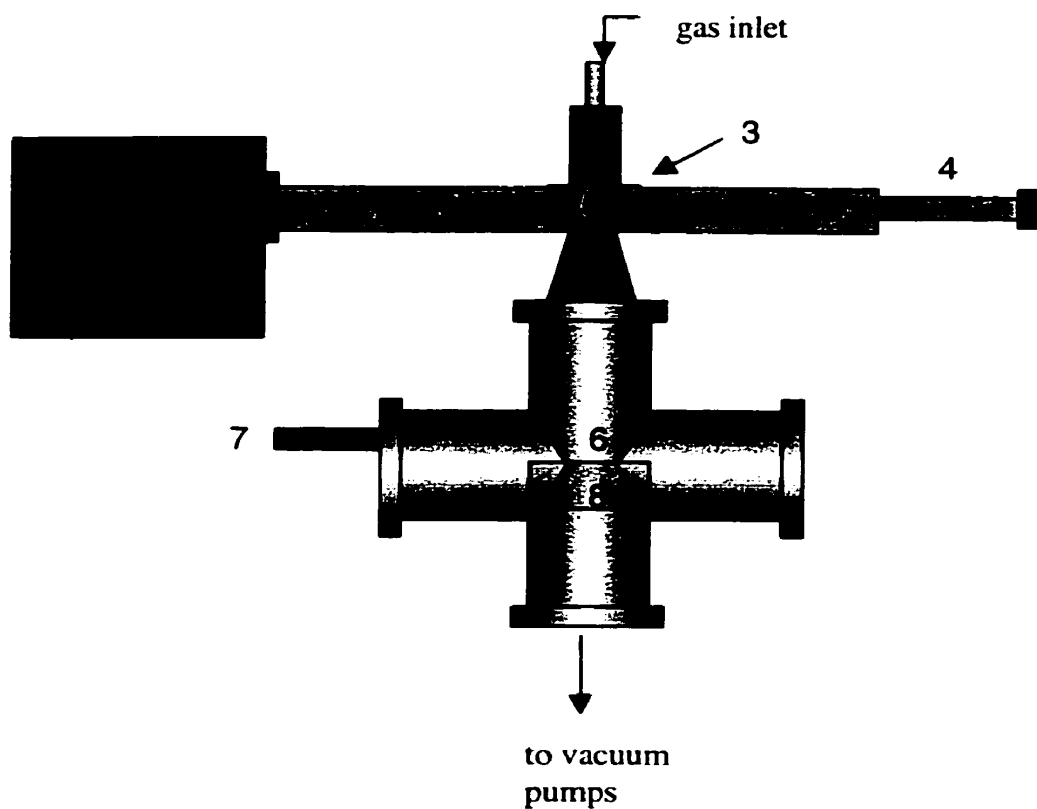
**Figure 3.2 :** Stainless steel containers for the bacterial spore suspension. The lid is used to carry the receptacle from and to the microbiology laboratory.



**Figure 3.3 :** Sample holder to accommodate four receptacles: a) top view and b) lateral view.

Gas circulation in the system relies on vacuum mechanical pumps which yield a base pressure of 10-20 mTorr. On each experiment, the samples are evacuated for approximately 5 minutes down to the base pressure before plasma operation. The gas pressure, measured with a capacitive membrane gauge, is set in the 1-7 Torr range.

The plasma sterilizer tested at Grenoble, shown in Fig. 3.4, was basically similar to that of Montréal. The plasma was also supplied by a surface-wave sustained discharge, but with a waveguide-surfatron as the wave launcher (waveguide feed) [12]. The discharge tube, made from fused silica, had an inner diameter of 40 mm and the cylindrical members of the reactor chamber, made from stainless steel in this case, were 150 mm in diameter. The substrate holder and the sample receptacles were the same as in Montréal. The experiments on the influence of the substrate temperature were made with the Grenoble system.



**Figure 3.4 :** The sterilizer system used in Grenoble. 1, microwave power generator (2.45 GHz); 2, WR-340 waveguide feed; 3, plasma source with a waveguide-surfatron wave launcher; 4, waveguide movable short-circuit; 5, fused silica discharge tube; 6, stainless steel processing chamber; 7, Pirani pressure gauge and, 8, sample holder. Note that, in this arrangement, in contrast to that of Montréal (Fig. 3.1), the gas flows perpendicularly to the spore receptacle.



### 3.3.2 Test spores used and accompanying microbiological procedure

#### 3.3.2.1 Biological indicators

Biological indicators in the form of paper strips are current standards in the testing of the efficacy of sterilizers of the steam autoclave and dry heat types [13]. Strips of *B. subtilis* var. *niger* (ATCC 9372) and *B. stearothermophilus* (ATCC 7953) were used. These indicators (30 mm length strips) were removed from their package (the sterilization efficacy being directly related to the number of species reaching the samples, the sterilization of packaged items may require longer treatment times). Once exposed to the plasma afterglow standing up within the receptacles (Fig. 3.2), they were placed in Tryptic Soy Broth (15 g) in 500 ml of sterile water containing Phenol Red (9 mg), and then incubated for 72 hours at 56°C. Whenever the Phenol Red turned yellow after incubation, the test was considered positive for bacterial growth and the sterilization process regarded as ineffective [14].

#### 3.3.2.2 Bacterial spore seeding and counting through colony forming unit (CFU)

The spore suspensions were prepared by vortexing *B. subtilis* paper strips in 30 ml of sterile water. Then, 500 µl of the suspension obtained ( $2 \times 10^6$ /ml) was inoculated in the stainless steel receptacles (Fig. 3.2), afterwards dried overnight and preserved under a sterile environment prior to afterglow exposure.

CFU counting was used to evaluate the number of survivors (biological indicators only state whether sterility has been attained or not). Recovery of the spores after plasma exposure was obtained by rinsing the receptacles with 10 ml of a solution of Tween 80 (5%) in 0.9% sodium chloride; the containers were further placed in a Branson 800 ultrasonic bath for 15 minutes in order to remove the remaining bacterial spores. Dilutions in sterile water were then streaked on Brain Heart Infusion (BHI) agar and incubated for 24 to 48 hours at 36°C. The number of colonies formed, each corresponding to one bacteria, was then enumerated [14].

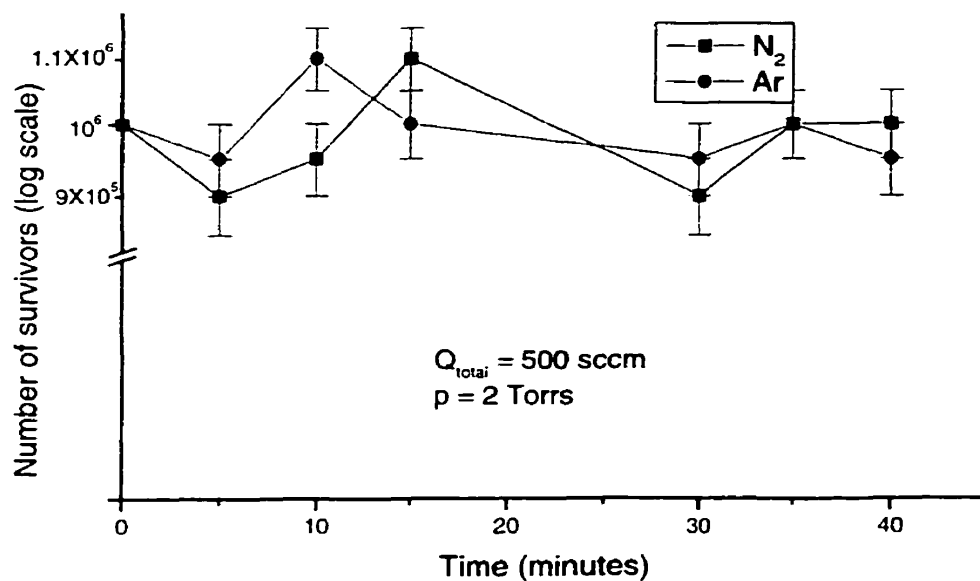
The results presented in the next section have been obtained under the supervision of two independent microbiologist teams (Prof. Barbeau's in Montréal and Col. Vidal's in Grenoble). The observed consistency in the data from these two laboratories as a function of the operating conditions indicates that the microbiology aspects of our work was carried out correctly.

### **3.4 RESULTS**

Our presentation follows the successive steps that we went through as we strove to understand the inactivation mechanisms of the bacterial spores by varying the operating conditions.

### 3.4.1 Reduced pressure operation without plasma

A first obvious question is to what extent the bacterial spores are damaged as the system is pumped down to its base pressure (10-20 mTorr) and as the spores are afterwards submitted, under reduced pressure conditions ( $\cong$  1 to 7 Torr), to a flowing gas even with the plasma source inoperative. Figure 3.5 shows the results of such an experiment with either N<sub>2</sub> or argon gas flowing at 500 standard cubic centimeter per second (sccm) at a pressure of 2 Torr as a function of exposure time; each data point is an average value over 5 different exposures at the same receptacle position (position 2, see below the insert in Fig. 3.10). Within the margin of errors, we observe no significant effect resulting from achieving vacuum in the sterilization chamber and further flowing dry gas over the receptacles.



**Figure 3.5 :** Number of survivors (*B. subtilis*) after having pumped down the system to 10-20 mTorr and flowing gas through it for different periods of time, the plasma source being off.

#### 3.4.2 Influence of the gas composition, flow rate and pressure

The experiments of this Sec. B were conducted with spore dilutions in the receptacle at position 2 at 100 W absorbed microwave power. Each data point corresponds to 6 different afterglow exposures.

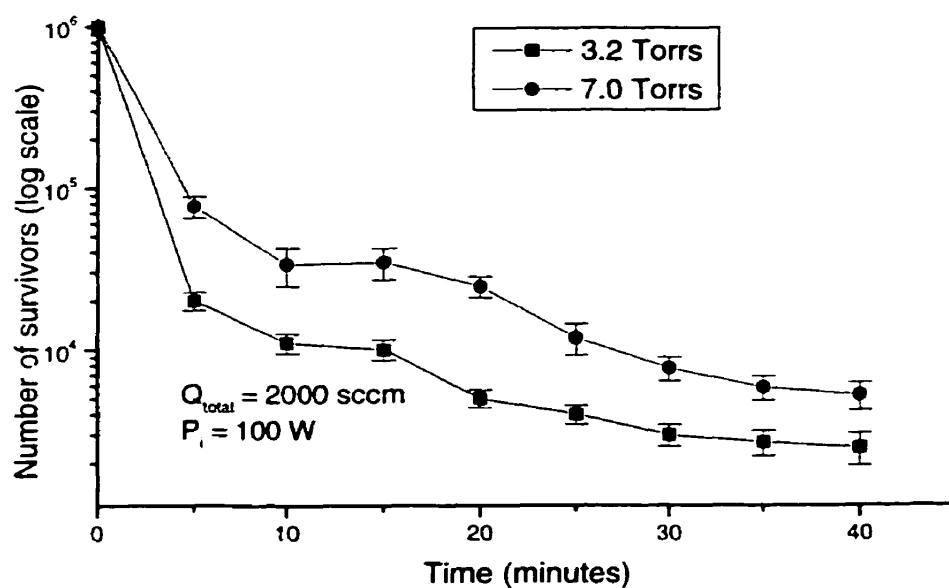
##### 3.4.2.1 Gas pressure and flow rate starting conditions

The value of these operating parameters in the sterilization chamber was adjusted initially by looking for conditions that maximize the intensity of the characteristic orange color emission of a pure  $N_2$  afterglow and at the same time ensure that this glow

illuminates the whole chamber uniformly. These conditions imply that the concentration of the emitting excited species formed in the afterglow is close to its maximum value (essentially a matter of gas pressure) and that these species are transported rapidly enough within the chamber (essentially a matter of gas flow). This led us to pressures in the 1-7 Torr range and gas flow rates of at least a few hundreds sccm.

#### 3.4.2.2 Pure argon afterglow

As our next step, we turned to a chemically inactive gas such as argon which, we therefore thought, should not inactivate spores. Figure 2.6 shows that this assumption was wrong since we observed a reduction by more than two orders of magnitude from an initial *B. Subtilis* population of  $10^6$ . The outgassing of various products adsorbed on the reactor wall, including humidity, was first advocated to explain this result, but this interpretation had to be rejected after modifications to the operating procedure were made and as suggested by the literature [16]. Finally, we had to assume that photons, not from the discharge itself since the interior of the receptacles is not in their line of sight but from the argon plasma afterglow, were responsible for the killing of spores. These photons are believed to be in the UV range (105-107 nm), and the corresponding emitting atoms to result most probably from collisions of ground state argon atoms with argon atoms in a metastable state (e.g.  $^3P_2$  level), the metastable atoms being available throughout the chamber thanks to the flowing afterglow.

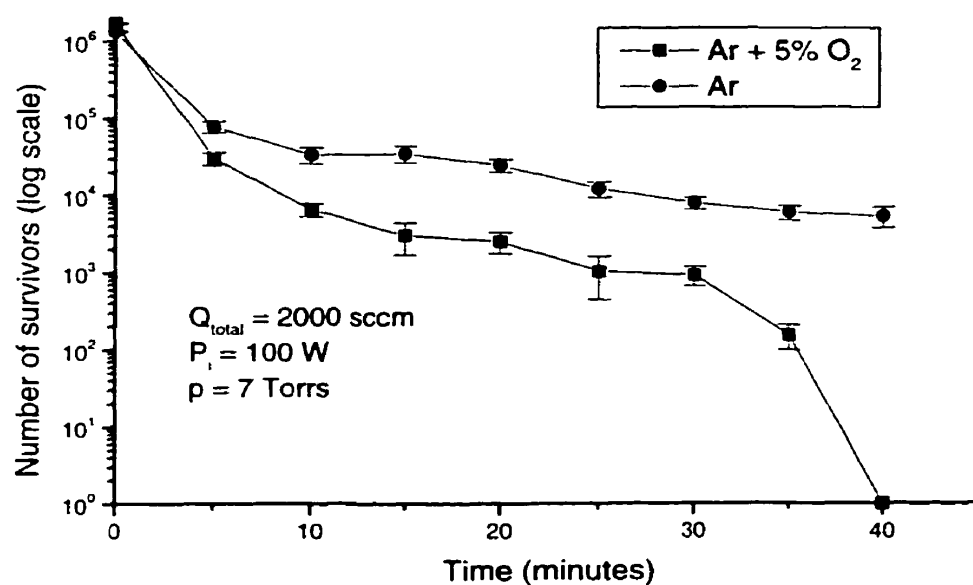


**Figure 3.6 :** Evolution of the population of spores, as a function of time, when they are submitted to a pure argon afterglow, for two different gas pressures in the sterilization chamber (receptacle at position 2).

Figure 3.6 suggests a two-phase mechanism resulting from an initial rapid inactivation process, followed by a slower one. The figure also shows that spore inactivation is slightly pressure dependent.

### 3.4.2.3 Adding O<sub>2</sub> to the Ar discharge

Various authors had reported earlier that the presence of oxygen in the discharge greatly enhances the inactivation of spores by plasma [5, 14, 16-19]. We thus added O<sub>2</sub> to our initial argon gas to achieve a 5%O<sub>2</sub>/argon mixture. Figure 3.7 shows that this led to a 6-log total inactivation of the initial spore population after 40 minutes (the data point at 10<sup>0</sup> on the log scale actually corresponds to no spore being detected which, strictly speaking, should be understood as indicating a high probability that the receptacle is sterile). This confirms the essential role of oxygen in the killing of spores.



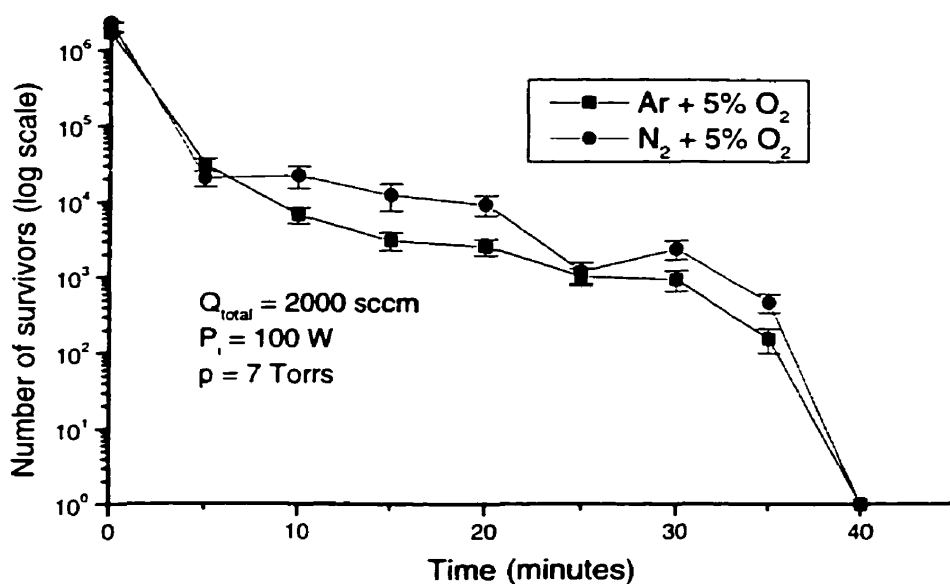
**Figure 3.7 :** Adding molecular oxygen to argon gas in the discharge ensures an afterglow leading to full inactivation of the spores (receptacle at position 2).

Note in Fig. 3.7 that full inactivation with the O<sub>2</sub> containing mixture seems to result from a triphasic mechanism when comparing with the pure argon discharge case.

#### 3.4.2.4 Comparing O<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> and O<sub>2</sub>/Ar afterglows

We replaced argon gas by a cheaper one, N<sub>2</sub>. Figure 3.8 compares the number of surviving spores as a function of exposure time to the afterglow when using 5%O<sub>2</sub>/argon and 5%O<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> mixtures, at the same pressure and flow rate. In both cases, the receptacles appear sterile after 40 minutes. The second phase of the inactivation mechanism differs from one gas to the other while the first and third phases seem to be independent of the gas used.



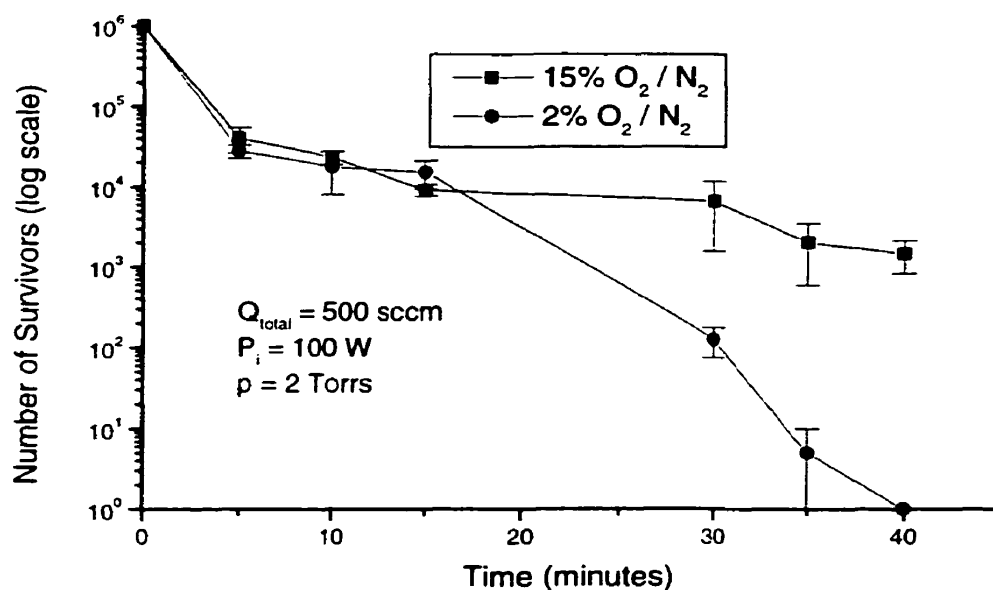


**Figure 3.8 :** Evolution of the spore population as a function of time when sustaining the discharge in two different oxygen containing mixtures (receptacle at position 2).

#### 3.4.2.5 The UV photons, the leading species

The next step was obviously to determine whether oxygen species or photons were the leading parameter. This question was worked out with an O<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> mixture. The action of O<sub>2</sub> was assumed to result from oxygen atoms (see discussion in Sec. IV) and, as suggested by spectroscopic measurements, the influence of UV radiation on the spores was assumed to be related to the strong UV intensity emission recorded in the afterglow from the (excited) NO molecules, presumably formed in the afterglow (250-320 nm range, so-called  $\beta$  system). We then used a titration method [20], which consists in adding NO gas in known quantity to the afterglow, to determine the O<sub>2</sub> percentage in the mixture that yields the highest oxygen atom concentration [O] in the afterglow; [O] was

found to reach a maximum value and saturate at  $O_2$  percentages higher than 12% in the  $O_2/N_2$  mixture. In contrast, the maximum in  $NO_\beta$  emission intensity goes through a sharp peak as a function of  $O_2$  at 2% $O_2$  in the mixture. Comparing the inactivation rate for both 2% $O_2$  and 15% $O_2$  in the mixture, Fig. 3.9 shows unambiguously that the UV photons are the driving species. When comparing the  $[O]$  value and the UV intensity at these two  $O_2$  percentages, we find that with the 2% $O_2/N_2$  mixture the UV intensity is 10 times higher than with 15% $O_2$  in the mixture while  $[O]$  is 20 times lower at 2% $O_2$ . Further results, not presented here, confirm that, under our operating conditions, there is always enough oxygen atoms in the afterglow to drive the spore inactivation process, the limiting parameter being therefore the UV intensity [5].



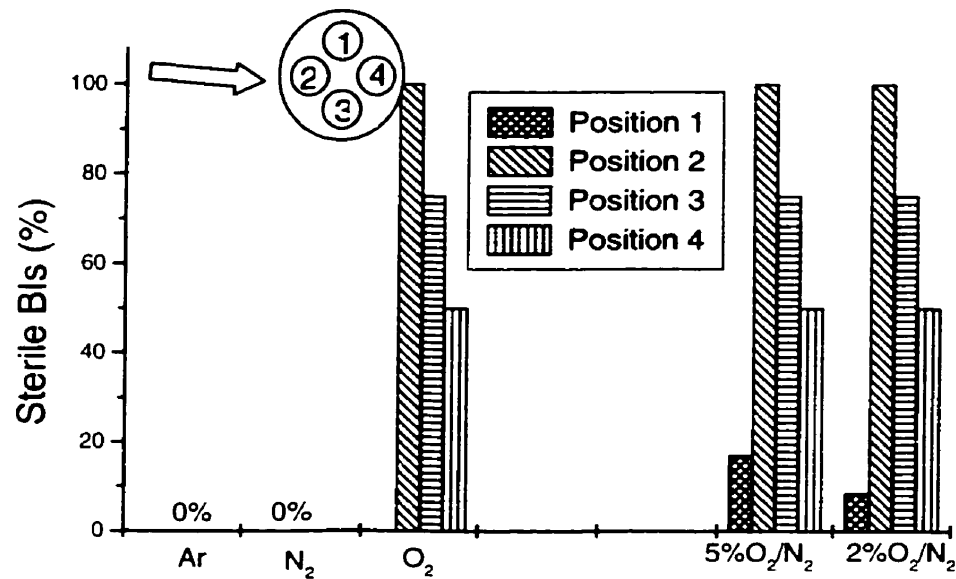
**Figure 3.9 :** Evolution of the spore population as a function of time in two different  $\text{O}_2/\text{N}_2$  mixtures: the mixture with 15% $\text{O}_2$  yields the highest oxygen atom concentration while the 2% $\text{O}_2$  one maximizes the  $\text{NO}_\beta$  UV emission.

### 3.4.3 Influence of the sample position in the afterglow chamber

Our initial experiments with the orange glow of the  $\text{N}_2$  flowing afterglow showed us that we could not achieve a perfectly uniform distribution of the excited species within the chamber and that this flow was slightly tilted with respect to the chamber axis (probably as a result of the discharge tube orientation at the entrance of the chamber); we also observed that too low a flow rate did not ensure full illumination of the chamber while too high a flow rate prevented the species from reaching the wall since they then flow across the chamber within some kind of virtual conical duct.

To determine the influence of the sample position within the chamber on the sterilization efficacy, we put biological paper strips in the 4 stainless steel receptacles placed in the substrate holder as shown in the insert of Fig. 3.10, where the arrow indicates the incoming gas flow. Recall that with biological indicators *absolute sterility* is needed to count the process as successful. At each position, we tested 12 samples (3 exposures of all 4 receptacles) which were submitted for 60 minutes to the afterglow from a plasma sustained with an absorbed power of 150 W. The operating conditions are presented in Table 3.1. The percentage of sterile indicators shown in Fig. 3.10 results from averaging the count for sterile and non sterile indicators at a given location. We see that pure argon and pure nitrogen discharges did not lead to full sterility (recall that Fig. 3.7 showed that with pure argon, only partial inactivation was obtained) whereas a pure oxygen discharge afterglow did. In cases where sterility was observed, position 2 was always the most favored one while position 1 was the worse one: the biological indicator in position 2 is exposed to the full incoming flow while receptacle 1 does not receive as many afterglow species because, as mentioned above, the flow is axially slightly tilted toward position 3. The reduction in the percentage of sterility of indicators 1, 3 and 4 as a group compared to indicator number 2 can be attributed to deflection of the flow on the obstacle created by receptacle number 2, which (like all containers) exceeds the substrate holder surface by 15 mm. This deflection effect can be seen by turning once more to the glowing  $N_2$  afterglow. The solution to a better uniformity of treatment requires lowering the gas pressure and flow rate, as will be discussed in Sec. IV [11].

The importance of the species uniform distribution on sterilization efficacy had been reported by Khomich *et al.* for direct plasma exposure conditions [7].



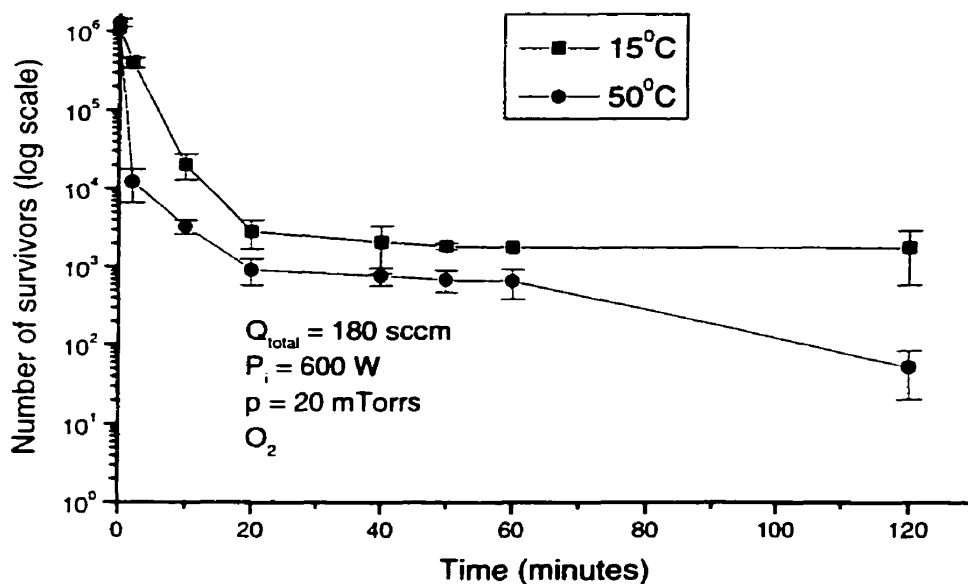
**Figure 3.10 :** Influence of the carrier position and gas composition on the sterility of the biological indicators (BIs).

**TABLE 3.1** : Operating conditions for determining the influence of the sample position in the afterglow chamber. Microwave absorbed power: 150 W.

Discharge gas	Gas flow rate (sccm)	Number of tests run
Ar	3000	12
N <sub>2</sub>	2000	12
O <sub>2</sub>	100	12
N <sub>2</sub> + 5% O <sub>2</sub>	2000	12
N <sub>2</sub> + 2% O <sub>2</sub>	2000	12

#### 3.4.4 Influence of the substrate temperature

This set of experiments was carried out with the Grenoble sterilizer which was operated at a much lower pressure and flow rate than the Montréal device (20 mTorr instead of 2-7 Torr and 180 sccm instead of at least 500 sccm), at higher microwave power (600 W instead of 100 W) and in a pure O<sub>2</sub> discharge. The aim was to see whether lowering the sample temperature would reduce or increase the sterilization efficacy. Figure 3.11 shows that lowering the sample temperature reduces the spore destruction rate (each data point in this figure is the average value obtained over 6 different afterglow exposures of one receptacle located at the same position). Reasons for this behavior are presented below.



**Figure 3.11** : Influence of the substrate temperature on the sterilization efficacy in a pure  $\text{O}_2$  afterglow. The reactor is that of Fig. 3.4.

### 3.5 DISCUSSION

We have designed and tested an efficient and novel sterilizer system making use of a flowing plasma afterglow. Total inactivation of *B. subtilis* with a  $10^6$  initial population can be obtained within 40 minutes. The spore destruction process results from a synergetic effect involving oxygen atoms and UV photons; the inactivation rate is limited by the UV intensity since there always seems to be enough oxygen atoms in the afterglow not to slow down the process [20]. Typical operating conditions are: a 2% $\text{O}_2/\text{N}_2$  gas mixture, a gas pressure in the 1-7 Torr range and a total gas flow rate between 0.5 and 3 liters/min. The flow of the active species across the chamber is a critical point of our system.

### 3.5.1 UV photons and oxygen atoms as the main inactivating species

Although previous studies had suggested that UV photons could play a key role in killing microorganisms with plasmas [22], clear evidences for this leading effect are presented here for the first time. In that respect, the experiment correlating the UV photon highest intensity as a function of the percentage of  $O_2$  in the  $O_2/N_2$  mixture with the highest inactivation rate is particularly convincing.

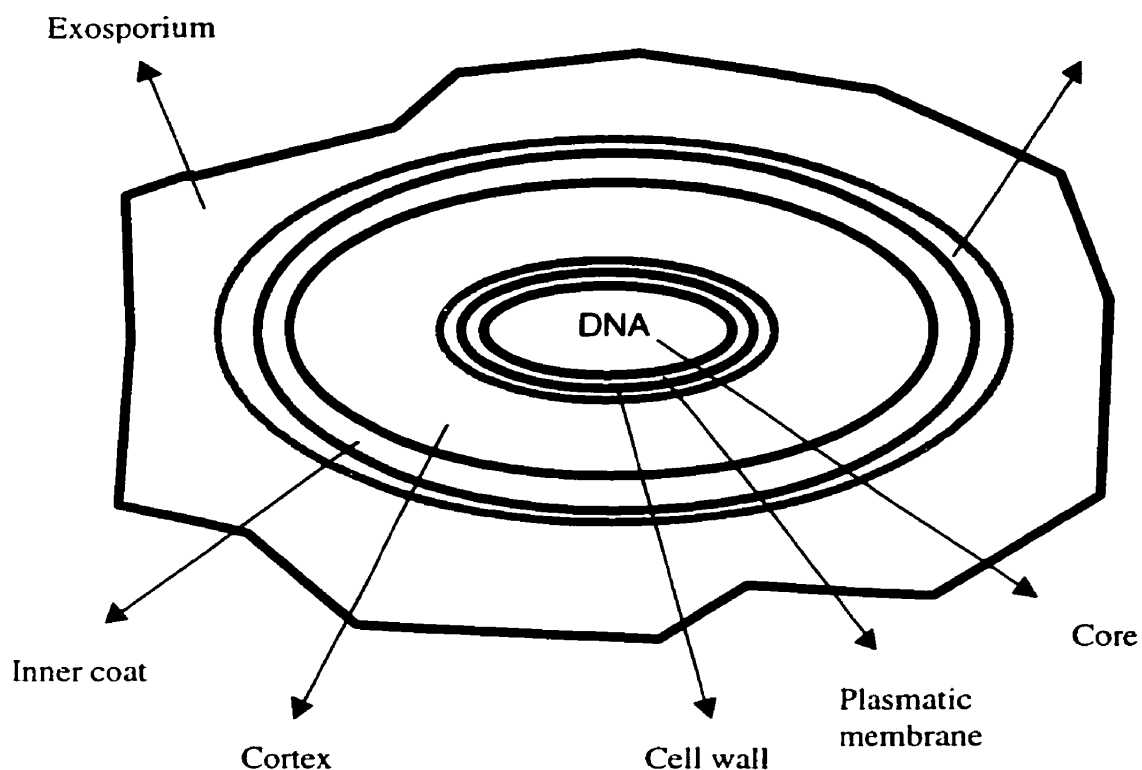
The contribution of oxygen atoms to the destruction of spores has been demonstrated earlier by Pelletier [17]. More recently, Kelly-Winterberg et al. [18] pointed out the destructive role of oxidizing agents in  $O_2$ -containing gas mixtures at atmospheric pressure without, however, specifically referring to oxygen atoms. The ozone concentration under our reduced pressure operating conditions is approximately  $10^{-4}$  less than that of  $O$ , which contrasts with the high concentration of  $O_3$  at atmospheric pressure [23]. The concentration of the  $O_2$  molecule in the metastable state  $\Delta$  (also called singlet  $O_2$ ) with 1 eV internal energy would need to be determined before completely discarding its involvement in the process; however, its contribution is likely to be comparatively weaker since it is well known that the reactivity of atomic oxygen is greater than that of this metastable state molecule.

### 3.5.2 Spore inactivation mechanisms

Figure 3.12 shows a schematic representation of a bacterial spore. Without going into microbiological details, one can say that the genetic material carried by the DNA helices



is, in the case of the spore form of the bacteria, protected by a series of “defense walls” or coats. Total inactivation of the spore is obtained when the DNA material is so heavily damaged that it cannot “repair” itself [24].



**Figure 3.12 :** Schematic representation of a bacterial spore with its genetic material (DNA) and protecting coats around it.

We have verified that bacterial spores are resistant enough that lowering the pressure from the ambient atmosphere to a significant vacuum (10-20 mTorr) does not destroy their membranes. Their dehydrated structure is responsible in part for this resistance to physical aggressors like heat and vacuum [25].

The role of the afterglow active species seems to be twofold: to create damages to the coats which, thereafter, allows the active species to destroy the genetic material. The respective contribution of photons and oxygen atoms to these processes is not known, but we can conjecture that: 1) the UV photons carry enough energy to break bonds in the coat materials and damage the DNA helices (the well known germicidal action of UV photons from, for example, Hg lamps could shed some light on these mechanisms); 2) the oxygen atoms participate in the chemical reactions of UV photons with the coats to form volatile products with, for example, carbon (CO and CO<sub>2</sub>) and hydrogen (water vapor) compounds, an etching process, while also, possibly, driving the slow combustion of the spore material [17].

### 3.5.3 Occurrence of steps in afterglow inactivation plots

In contrast to dry heat and autoclave systems where the decrease as a function of time of the number of microorganisms follows an exponential law, i.e. a straight line on a log scale (so-called D-plot), we observe a varying slope when plotting the logarithm of the number of surviving spores as a function of time. Such a behavior has been reported with other plasma sterilizers whereas the commercial plasma-based sterilizers show a classical linear D-plot [4]. One could therefore consider that the afterglow sterilization process is comprised of 2 or 3 different steps as a function of time. At this moment, we can only list potential reasons for this, as follows.

A first point is that in plasma systems there are two different types of active species, the photons and the O atoms, whereas in conventional sterilizers there is essentially only one active component, for example, water vapor in autoclaves. Furthermore, in our case, the sequence of action of the UV photons and oxygen atoms can change with the evolution of the damages to the spore which, for example, start with the coats and end with the DNA helices [5]. Another point is that there might be heterogeneity in the spore population, some of them being more resistant than others, a known fact with microorganisms [26]. Then, the initial slope in Fig. 3.7 for the case of the argon afterglow could be interpreted as resulting from the killing of weak spores followed by the slower inactivation of the more resistant ones. Note that in the particular case of pure argon, we believe that only UV photons are taking part in the process. When both photons and oxygen atoms are present, then the number of resistant spores is probably much smaller.

The piling up of spores has also been mentioned as a possible explanation of the multi-step process observed [16]. The non uniformity of action of the afterglow within the receptacle should also be examined. The surface roughness including cracks and other defects where the spore can be hidden probably leads to a different interaction of the microorganisms with the plasma afterglow than with the high pressure (+ 1 bar) and high temperature water vapor of autoclaves.

### 3.5.4 The influence of the substrate temperature

The influence of the substrate temperature on the sterilization efficiency can be examined by considering that damages to the spore result from a selective etching mechanism (as encountered with microelectronic circuit fabrication), which is a three-step process: adsorption of the reactive species (essentially O atoms) on the bacterial spore surface, reaction on the surface between the reactive species and the bacterial spore, desorption of the product of the latter reaction in the form of a volatile compound, as mentioned above. The substrate temperature  $T$  affects, although much differently, all of the above steps related to the etching process.

The adsorption time  $\tau_{\text{ads}}$  decreases exponentially with increasing  $T$  since

$$\tau_{\text{ads}} = \frac{1}{f} \exp\left(\frac{L}{kT}\right)$$

where  $f$  is the oscillating frequency of the surface atoms or molecules,  $L$  is the adsorption energy and  $k$  is the Boltzmann constant [11]. To ensure an efficient surface coverage,  $\tau_{\text{des}}$  should be long enough. A similar equation (with a negative sign in the exponential argument) applies to the desorption step of the byproducts of the reaction, which requires for a good etching efficiency a desorption time  $\tau_{\text{des}}$  smaller than  $\tau_{\text{ads}}$ , thereby suggesting the existence of an optimum temperature value for such a process. It is clear that etching mechanisms are specific to plasma sterilization as opposed to conventional systems, and these mechanisms might therefore be involved in the multi-step process that we observe.

### 3.5.5 Hydrodynamics of the gas flow

Controlling the gas flow so it gets into contact with all parts of the object to be sterilized is essential in the plasma afterglow method.

We have seen from examination of the pure  $N_2$  afterglow that a high gas pressure combined with a high flow rate (typically  $\geq 7$  Torr and  $\geq 3$  L/min) leads to the formation of virtual flow ducts and also to a significant deflection of the incoming flow when it hits an obstacle. This is why we have limited our operating pressure to 2 Torr and 500 sccm when we optimized the  $O_2/N_2$  mixture. Conversely, working at 7 Torr with flow rates of 3 L/min, as we did to determine the influence of the receptacle position, leads to non uniformity of treatment. Therefore, these operating parameters should be chosen such as to allow for diffusion of the gas everywhere in the chamber; the minimum values of pressure and flow rate are in turn determined by the necessity of bringing the limited-lifetime active species rapidly enough everywhere within the chamber; decreasing the pressure, and therefore collision frequencies, increases the active particles lifetime. Working with higher gas pressures and flow rates could be envisaged by using, for example, a rotating carrousel carrying the objects to be sterilized.

### 3.6 CONCLUSION

We have presented the results of a parametric study of the operating conditions of a plasma flowing afterglow sterilizer. The essential role of UV photons and oxygen atoms was evidenced, but the mechanisms of spore inactivation are not known. This new sterilizer depends critically on the hydrodynamics of the gas flow and its design should, therefore, be adapted to this feature, for example, by using a rotating carrousel to hold the medical devices to be sterilized. The level and type of damages caused to the sterilized objects also need to be investigated. Such damages could probably be reduced by optimizing the gas composition; this would allow, for example, to select the most appropriate spectral range of the UV photons (damage versus sterilization efficacy). The sterilization of already packaged devices, a current procedure, should be examined, which eventually implies looking for materials more permeable to the afterglow active species. Finally, there remains to determine to what extent the present afterglow sterilization method is selective with respect to other kinds of microorganisms such as, for example, mycobacteria.

The experiments were carried out on two different experimental arrangements with different dimensions, wall material and operating conditions under the supervision of two different teams of microbiologists. Nonetheless, the same trends were observed for the inactivation efficiency as a function of operating conditions.

### **3.7 ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors would like to acknowledge the financial support of the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada and of the Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR) of Québec. The authors are grateful to Annie Leduc (Université de Montréal), Françoise Desor and Dr. Dominique Vidal (Centre de Recherche des Services de Santé des Armées, France) for their assistance with the microbiology aspects of the work. The authors would also like to mention the skilful technical support provided by François Roy and Robert Lemay (Université de Montréal) and by Michel Rohr (Metal Process, Meylan, France). Finally, we express our gratitude to Dr. Thierry Lagarde and Dr. Charles Mitzner (Metal Process, Meylan, France) for their scientific assistance.

### 3.8 REFERENCES

1. MOREAU, S., MOISAN, M., TABRIZIAN, T., BARBEAU, J. and YAHIA, L'H. (2000). Gas Plasma Sterilization : Past, Present and Future. Submitted to American Journal of Infection Control.
2. MOISAN, M., MOREAU, S., TABRIZIAN, M., PELLETIER, J., BARBEAU, J., and Yahia, L'H. (1999). Canadian Patent Application, serial number 2 273 432.
3. MENASHI, W.P. (1968) U.S. Patent 3,383,163.
4. KREBS, M.C., BÉCASSE, P., VERJAT, D. and DARBORD, J.C. (1998). Gas – Plasma Sterilization : Relative Efficacy of the Hydrogen Peroxide Phase Compared With That of the Plasma Phase. International Journal of Pharmaceutics, 160, 75-81.
5. MOREAU, S., TABRIZIAN, M., MOISAN, M., BARBEAU, J. and YAHIA, L'H. (1999). The Role of Atomic Oxygen and UV Emission in Gas Plasma Afterglow Sterilization. 19<sup>th</sup> Annual Meeting of the Canadian Society For Biomaterials, Québec, June.
6. MOREAU, S., TABRIZIAN, M., BARBEAU, J., MOISAN, M., LEDUC, A., PELLETIER, J., LAGARDE, T., ROHR, M., DESOR, F., VIDAL, D., RICARD, A. and YAHIA, L'H. (1999). Optimum Operating Conditions Leading to Complete Sterilization at Low Substrate Temperatures in a Plasma Flowing Afterglow. Proceedings of the 12<sup>th</sup> International Colloquium on Plasma Processes : Le Vide : science, technique et applications, supp. 291, 46-50, Antibes, France.



7. KHOMICH, A.V., SOLOSHENKO, I.A., TSIOLKO, V.V. and MIKHNO, I.L. (1997). Proceedings of the 12<sup>th</sup> International Conference on Gas Discharges & Their Applications, Greifswald, Germany.
8. MOISAN, M., LEPRINCE, P., BEAUDRY, C. and BLOYET, E. (1977). U.S. Patent 4,049,940.
9. MOISAN, M., ZAKRZEWSKI, Z. and PANTEL, R. (1979). Journal of Physics D : Applied Physics, 12, 219-237.
10. MOISAN, M. and ZAKRZEWSKI, Z. (1992). Microwave Excited Discharges, edited by M. Moisan and J. Pelletier (Elsevier, Amsterdam, 1992), chap. 5.
11. HURY, S. (1997). Optimisation d'un procédé de stérilisation pour plasma froid. Rapport de Diplôme d'Études Approfondies (DEA), Université Joseph-Fourier (Grenoble).
12. MOISAN, M., CHAKER, M., ZAKRZEWSKI, Z. and PARASZCZAK, J. (1987). Journal of Physics E : Scientific Instrumentation, 20, 1356-1361.
13. WOOD, R.T. (1993). Sterilization Technology : A practical guide for manufacturers and users of health care products, R.F. Morrissey & G. Briggs Phillips éd., Van Nostrand Reinhold, New York, 81-85.
14. MOREAU, S., TABRIZIAN, M., MOISAN, M., BARBEAU, J. and YAHIA, L'H. (1998). Effects of Gas Plasma Parameters on the Bacterial Spores Destruction Rate. 18<sup>th</sup> Annual Meeting of the Biomedical Engineering Society, Cleveland, October.

15. BAIER, R.E., CARTER, J.M., SORENSEN, S.E., MEYER, A.E., MCGOWAN, B.D. and KASPRZAK, S.A. (1992). Radiofrequency Gas Plasma (Glow Discharge) Disinfection of Dental Operative Instruments, Including Handpieces. Journal of Oral Implantology, 18 : 3, 236-242.
16. HURY, S., VIDAL, D.R., DESOR, F., PELLETIER, J. and LAGARDE, T. (1998). A Parametric Study of the Destruction Efficiency of Bacillus spores in Low Pressure Oxygen-Based Plasmas, Letters in Applied Microbiology, 26, 417-421.
17. PELLETIER, J. (1993). La Stérilisation par le Procédé Plasma. Agressologie, 33 : 2, 105-110.
18. KELLY-WINTENBERG, K., MONTIE, T.C., BRICKMAN, C., ROTH, J.R., CARR, A.K., SORGE, K., WADSWORTH, L. and TSAI, P.P.Y. (1998). Room Temperature Sterilization of Surfaces and Fabrics with One Atmosphere Uniform Glow Discharge Plasma. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 20, 69-74.
19. VIDAL, D. et PELLETIER, J. (1996). Optimisation du procédé de stérilisation plasma, répondant au besoin des formations sanitaires de campagne. Rapport de fin de contrat, commande etas n°565/5034. Unité de Microbiologie, Centre de Recherche des Services de Santé de l'Armée (CRSSA).
20. MÉREL, P., TABBAL, M., MOISAN, M. and RICARD, A. (1998). Plasma Sources, Science & Technologies, 7, 550-556.

21. MOREAU, S., TABRIZIAN, M., BARBEAU, J., MOISAN, M., LEDUC, A., PELLETIER, J., LAGARDE, T., ROHR, M., DESOR, F., VIDAL, D., RICARD, A. and YAHIA, L'H. (1999). Essential Parameters for Plasma Sterilization. Proceedings of the 19<sup>th</sup> International Conference on Phenomena in Ionized Gases, Warsaw, Poland.
22. CHAU, T.T., KAO, K.C., BLANK, G. and MADRID, F. (1996). Microwave Plasmas for Low-Temperature Dry Sterilization, Biomaterials, **17**, 1273-1277.
23. FALKENSTEIN, Z. (1999). Effects of the O<sub>2</sub> Concentration on the Removal Efficiency of Volatile Organic Compounds with Dielectric Barrier Discharges in Ar and N<sub>2</sub>. Journal of Applied Physics, **85** : **1**, 525-529.
24. DRICKS, A. (1999). The Bacterial Spore. Microbiology and Molecular Biology Reviews, **63** : **1**, 1-37.
25. YOUNG, J.H., Sterilization with Steam Under Pressure. Sterilization Technology : A practical guide for manufacturers and users of health care products, R.F. Morrissey & G. Briggs Phillips éd., Van Nostrand Reinhold, New York, 120-151.
26. PRESCOTT, L., HARLEY, J.P. and KLEIN, D.A. (1995). Le Contrôle des Micro-Organismes par les Agents Physiques et Chimiques. Microbiologie, DeBoeck-Université, Bruxelles, 310-324.

## ***CHAPITRE 4 – SPECTROSCOPIE PAR TITRAGE DE NO***

---

Dans le but d'optimiser le procédé de stérilisation par plasma différé, il est important de bien comprendre les différents mécanismes qui prennent place entre les espèces actives du plasma en post-décharge et la spore bactérienne. Pour ce faire, une caractérisation de la post-décharge fut faite en utilisant une méthode bien connue : le titrage par oxyde nitrique (NO). Cette méthode permet l'identification des espèces réactives qui se trouvent à l'intérieur même de la chambre de traitement. Malheureusement, comme l'enceinte de plasma différé était faite de Pyrex, elle ne laissait pas passer les longueurs d'onde sous les 300 nm. La région ultraviolette lointaine du spectre électromagnétique était donc inobservable. Toutes les acquisitions spectrales se sont effectuées entre les longueurs d'onde suivantes : 300 nm et 600 nm. Cette région était suffisante pour voir et identifier les différents systèmes et constituants de la post-décharge.

Grâce à cette méthode spectroscopique, plusieurs espèces purent être identifiées et l'observation du nombre de spores survivantes après un traitement au plasma permit une corrélation entre les espèces présentes et l'efficacité du traitement. De cette façon, le procédé put être optimisé au maximum tout en comprenant les différents mécanismes de destruction inhérents au plasma différé.

Ces mesures permirent également de vérifier l'influence qu'avait le matériau constituant l'enceinte de traitement sur l'efficacité du procédé de stérilisation. En effet, les

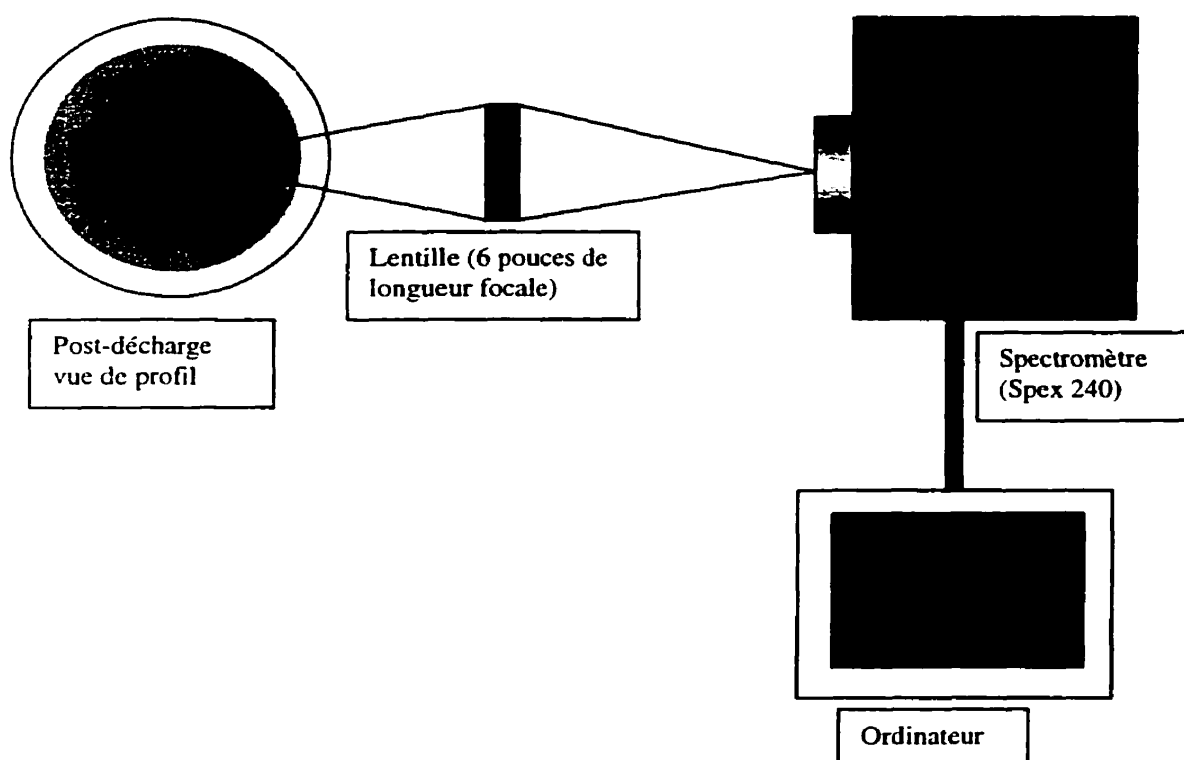
mécanismes de perte reliés aux parois du réacteur peuvent avoir une influence non négligeable selon que l'enceinte soit faite de Pyrex ou d'aluminium par exemple. Les résultats obtenus montrent clairement qu'effectivement les parois jouent un rôle important nécessitant donc de tenir compte des parois comme paramètre d'optimisation du procédé.

#### ***4.1 Introduction***

La caractérisation de la post-décharge d'un mélange gazeux permet l'identification rapide et efficace des différentes espèces produites lors de la décharge électrique. La méthode de titrage par NO est très utile pour quantifier ces mêmes espèces. Par contre, cette technique spectroscopique possède certaines limites comme le domaine de pressions dans lequel elle est effective. En effet, ces analyses spectroscopiques peuvent être effectuées dans un intervalle de pression situé entre 1 et 5 Torr. Aux plus fortes pressions, l'état  $\text{NO}_2^*$  est désexcité par collisions avec les molécules neutres avant d'émettre les photons (*quenching*) [1]. Comme nos expériences sur la stérilisation se sont pratiquement toutes effectuées entre ces pressions, le titrage par NO s'avérait donc une technique de choix pour caractériser les éléments constitutifs du plasma différé.

#### 4.2 Spectroscopie par titrage de NO : principes et résultats préliminaires

Le montage utilisé pour ces mesures spectroscopiques est le même que décrit précédemment dans le deuxième article inclus dans ce mémoire [2]. La seule différence notable est l'ajout d'un montage optique afin de pouvoir faire les mesures. Le montage est décrit sur la figure 4.1.



**Figure 4.1 :** Montage spectroscopique.

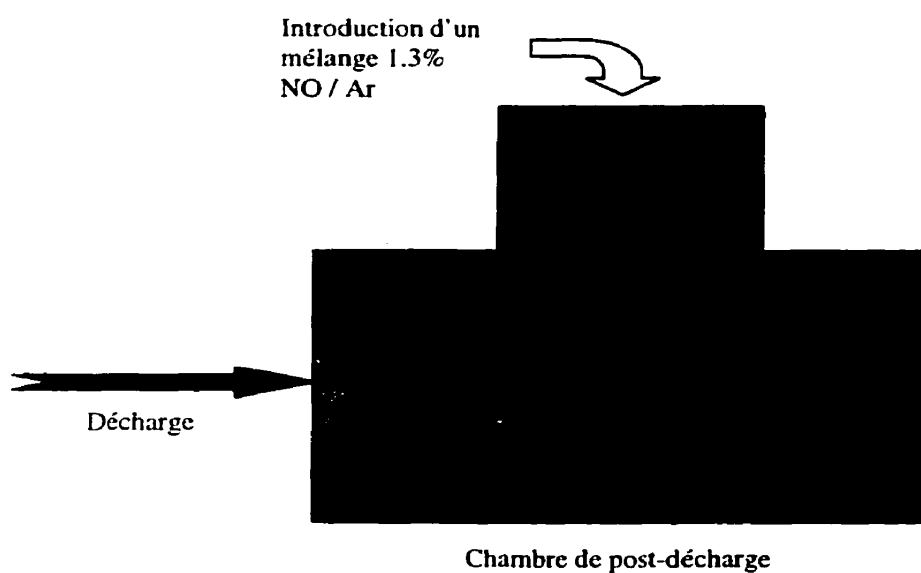
Les photons émis par la post-décharge sont captés par la lentille qui est placée à 6 pouces (15.24 cm) de la zone excitée et à 6 pouces également de la fenêtre d'entrée du spectromètre. En plaçant la fenêtre d'entrée du spectromètre à la distance focale de la lentille, le maximum d'intensité lumineuse peut être récupéré et analysé par l'ordinateur. Le spectromètre capte donc les photons émis par le plasma différé et à l'aide d'un photomulticateur, transforme l'impulsion lumineuse en impulsion électronique ce qui permet d'envoyer un signal électrique à l'ordinateur qui, à son tour, analyse les données et affiche les résultats sur un écran.

#### ***4.2.1 Principes généraux du titrage par NO***

Les principes de base du titrage par NO diffèrent selon les mesures voulues. En effet, lors du dosage des atomes d'azote par exemple, certaines bases théoriques s'appliquent. Par contre, lors de dosage d'oxygène atomique, d'autres méthodes de calculs vont s'appliquer. Bien que ces méthodes de quantification se ressemblent, il est important de bien différencier les bases sous-jacentes.

#### 4.2.1.1 Dosage de l'azote atomique dans un mélange $x\%$ $N_2$ / Ar

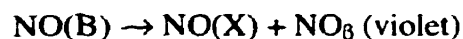
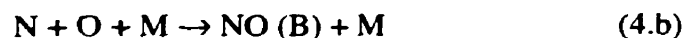
Pour réussir à quantifier les atomes d'azote dans un mélange  $O_2$  /  $N_2$ , il est important d'effectuer un premier dosage à l'aide d'une post-décharge d'un mélange  $x\%$   $N_2$  / Ar où  $x \leq 6$ . Un mélange 1.3% NO / Ar est introduit directement dans la post-décharge comme montré sur la figure 4.2.



**Figure 4.2 :** Schéma illustrant l'introduction du mélange servant à faire les analyses spectroscopiques par titrage de NO.

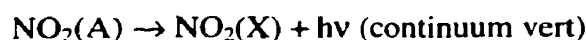
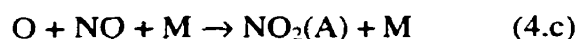


Tout d'abord, lors de l'introduction du mélange 1.3% NO / Ar, il y a l'observation d'une luminescence violette produite par les réactions suivantes :



où  $\text{M} \approx \text{Ar}, \text{N}_2, \text{NO}$ .

Pour observer les bandes  $\text{NO}_\beta$ , il faut à la fois des atomes d'azote et des atomes d'oxygène. Lorsque le débit de NO introduit dans la post-décharge est inférieur à celui des atomes d'azote ( $Q_{\text{NO}} < Q_{\text{N}}$ , où  $Q$  est le débit), la réaction (4.a) est favorisée. En augmentant le débit de NO, l'émission de  $\text{NO}_\beta$  diminue pour atteindre l'extinction lorsque  $Q_{\text{NO}} = Q_{\text{N}}$ . Lorsque le débit de NO continue d'être augmenté après la zone d'extinction, les réactions suivantes sont observées :



Il apparaît alors une post-luminescence verte. Entre les deux couleurs : violet de  $\text{NO}_\beta$  et vert de  $\text{NO}_2(\text{A-X})$ , il y a la zone d'extinction qui correspond à l'égalité suivante :

$$Q_{\text{NO}} = Q_{\text{N}} \quad (4.1)$$

L'émission de  $\text{NO}_2(\text{A-X})$  est décrite par l'équation suivante :

$$I_{\text{NO}_2} = K_{\text{NO}_2} \cdot [\text{NO}_2(\text{A})] \quad (4.2)$$

où  $K_{\text{NO}_2}$  est un coefficient qui dépend de la réponse spectrale du spectromètre et de la fréquence radiative de  $\text{NO}_2(\text{A-X})$ . Les crochets des équations (4.2) et (4.3) indiquent les densités.

La densité de  $\text{NO}_2^*$  est donnée par l'équation suivante :

$$[\text{NO}_2(\text{A})] = \frac{[\text{O}] \cdot [\text{NO}] \cdot [\text{M}] \cdot k_c^{\text{M}}}{\nu_r^{\text{A}} + [\text{M}] \cdot k_Q^{\text{A}}} \quad (4.3)$$

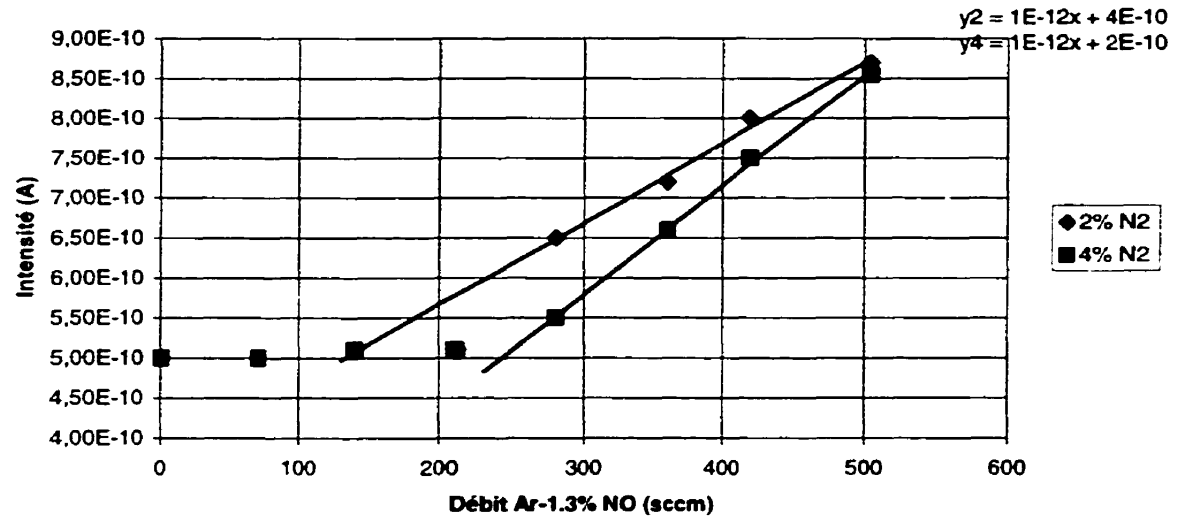
où  $k_c^{\text{M}}$  est le coefficient de la réaction (4.c),  $\nu_r^{\text{A}}$  est la fréquence radiative de  $\text{NO}_2(\text{A-X})$

et  $k_Q^{\text{A}}$  est le coefficient de destruction de  $\text{NO}_2(\text{A})$  par les espèces  $\text{M} = \text{Ar}, \text{N}_2, \text{NO}$  [3].

Lorsque la réaction (4.c) commence à se produire, tous les atomes d'azote ( $[\text{N}]_0$ ) auront réagi pour former des atomes d'oxygène et il se produira l'égalité suivante :

$$[\text{O}] = [\text{N}]_0 \quad (4.4)$$

La variation d'intensité  $I_{\text{NO}_2}$  avec  $\text{NO}$  est représentée sur la figure 4.3 pour deux mélanges 2%  $\text{N}_2 / \text{Ar}$  et 4%  $\text{N}_2 / \text{Ar}$ , au débit total de 500 sccm, à une pression de 2.3 Torr et une puissance micro-onde de 100 watts.



**Figure 4.3 :** Variation de  $I_{\text{NO}_2}$  en fonction du débit de Ar-1.3% NO dans une post-décharge Ar-N<sub>2</sub>.

L'extinction (intersection entre les droites et le bruit de fond) correspond à la réaction (4.1) qui se produit aux débits de NO ( $Q_{\text{NO}} = 0.013 \times Q_{\text{1.3\% NO / Ar}}$ ) de 2.3 et 3.4 sccm pour les mélanges 2% et 4% de N<sub>2</sub> dans Ar respectivement. Il est alors possible de calculer les rapports suivants :

$$\frac{[N]}{[N_2]} = \frac{Q_N}{Q_{N_2}}$$

de 0.23 et 0.17 (soit des degrés de dissociation  $[N]/2[N_2]$  de moitié) pour ces deux mélanges. Il correspond à la pression de 2.3 Torr une densité de :

$$2.3 \cdot 3.2 \times 10^{16} = 7.4 \times 10^{16} \text{ cm}^{-3}$$

soit

$$[N_2] = 1.5 \times 10^{15} \text{ cm}^{-3}$$

à 2% N<sub>2</sub> et

$$[N_2] = 3.0 \times 10^{15} \text{ cm}^{-3}$$

à 4% N<sub>2</sub>. Il est alors possible d'en déduire que  $[N]_0$  (2% N<sub>2</sub>) =  $3.5 \times 10^{14} \text{ cm}^{-3}$  et  $[N]_0$  (4% N<sub>2</sub>) =  $5.1 \times 10^{14} \text{ cm}^{-3}$ . À partir des équations (4.2), (4.3) et (4.4), nous avons :

$$I_{NO_2} = K_{NO_2} \cdot \frac{[N]_0 \cdot [M] \cdot k_C^M}{v_r^A + [M] \cdot k_Q^A} \quad (4.5)$$

La variation linéaire  $I_{NO_2} = f([NO])$ , telle que représentée sur la figure 4.3, est caractérisée par la pente  $r_1$  telle que :

$$r_1 = K_{NO_2} \cdot \frac{[N]_0 \cdot [M] \cdot k_C^M}{v_r^A + [M] \cdot k_Q^A} \quad (4.6)$$

Il est alors possible de constater, sur la figure 4.3, que le rapport  $r_1/[N]_0$  est pratiquement constant.

Ces résultats montrent que M = Ar agit principalement dans les réactions (4.c) et dans la destruction de NO<sub>2</sub>(A). En effet, il est montré dans [3] qu'aux pressions supérieures à 1 Torr, il y a les inégalités et égalités suivantes :  $[M] \cdot k_Q^A > v_r^A$  et  $k_C^{Ar} \equiv k_C^{N_2}$ , de même

que  $k_{Ar}^A \equiv k_{N_2}^A$ . Le quantité de NO introduite est alors inférieure à  $10^{15} \text{ cm}^{-3}$ . De plus, si  $k_C^{NO}$  et  $k_{NO}^A$  ne sont pas plus de 10 fois supérieurs à  $k_C^{Ar}$  et  $k_{Ar}^A$ , l'équation (3.6) se simplifie de la manière suivante :

$$r_1 = [N]_0 \cdot K_{NO_2} \cdot \frac{k_C^{Ar}}{k_{Ar}^A}$$

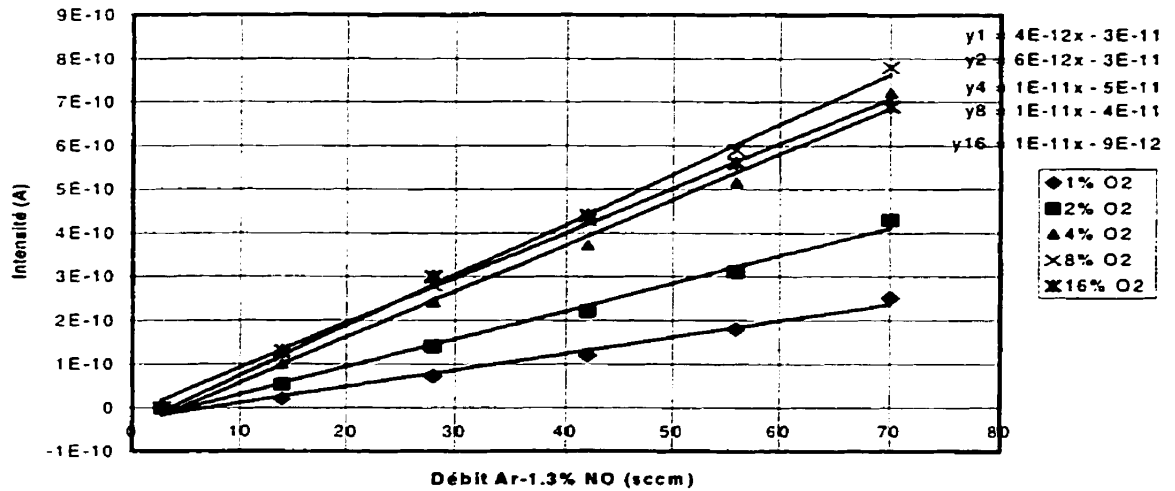
#### 4.2.1.2 Dosage de l'oxygène atomique dans une post-décharge x% O<sub>2</sub> / Ar

Ce dosage consiste à remplacer N<sub>2</sub> par O<sub>2</sub> pour produire des plasmas x% O<sub>2</sub> / Ar. En introduisant du NO directement dans la post-décharge comme montré précédemment, la réaction (3.c) se produira.

À partir des équations (3.2) et (3.3), il est possible d'écrire :

$$I_{NO_2} = K_{NO_2} \cdot \frac{[O] \cdot [M] \cdot k_C^M}{v_r^A + [M] \cdot k_Q^A} \cdot [NO] \quad (3.8)$$

où cette fois-ci, [O] représente la densité des atomes d'oxygène produite par la décharge x% O<sub>2</sub> / Ar. Les variations de  $I_{NO_2} = f([NO])$  sont représentées sur la figure 3.4 pour des mélanges O<sub>2</sub> / Ar à des pourcentages [O<sub>2</sub>]/[Ar] entre 1% et 16%. Ici, le débit d'argon est constant et égal à 500 sccm.



**Figure 4.4 :** Variation de  $I_{NO_2}$  en fonction du débit de Ar-1.3% NO dans une post-décharge Ar-O<sub>2</sub>.

Des variation linéaires sont observées, telles que :

$$r_2 = K_{NO_2} \cdot \frac{[O] \cdot k_C^{Ar}}{k_{Ar}^A} \quad (3.9)$$

En écrivant l'équation (3.9), il est supposé, comme l'équation (3.7), que l'argon est l'élément dominant dans la réaction (3.c) et dans la destruction de NO<sub>2</sub>(A), c'est-à-dire que les coefficients  $k_C^{O_2}$  et  $k_{O_2}^A$  ne sont pas 10 fois supérieurs à ceux de l'argon.

À partir des équations (3.7) et (3.9), il est possible d'obtenir :

$$[O] = \frac{r_2}{r_1} \cdot [N]_0 \quad (3.10)$$

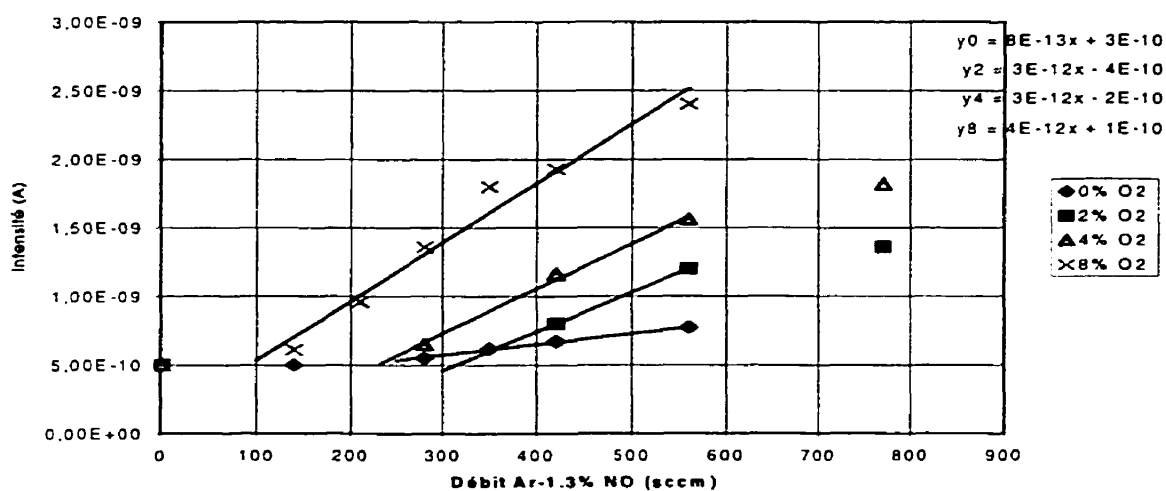
Les densités [O] à partir de celle de [N]<sub>0</sub>, en mesurant  $r_1$  et  $r_2$ , sont ainsi obtenues.

Sur la figure 3.4, une croissance de  $[O]$  avec le % d' $O_2$ , avec un maximum à 8% d' $O_2$  est observée. Le degré de dissociation  $[O]/2[O_2]_0$  est voisin de 1 (0.9) avec 1% d' $O_2$  et diminue jusqu'à 0.15 avec 16% d' $O_2$ .

#### 4.2.1.3 Dosage de $[N]$ et $[O]$ dans les mélanges $x\% O_2 / N_2$

En partant avec une décharge de  $N_2$  pur, la concentration  $[N]_0$  à la suite des réactions (4.a, 4.b et 4.c) est déterminée.

La figure 4.5 reproduit les résultats obtenus pour 500 sccm de  $N_2$  à une puissance micro-onde de 100 W et à une pression de 2.3 Torr.



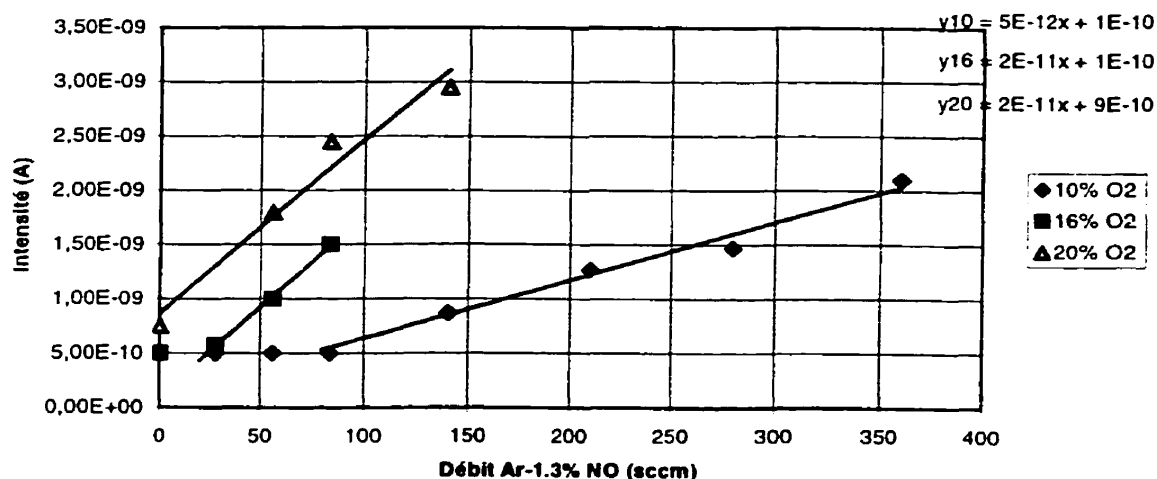
**Figure 4.5 :** Variation de  $I_{NO_2}$  en fonction du débit de Ar-1.3% NO dans une post-décharge  $O_2 / N_2$ .

Il est déterminé  $[N]_0/[N_2] = 0.4\%$  (degré de dissociation 0.2%) soit une densité  $[N]_0 = 2.8 \times 10^{14} \text{ cm}^{-3}$ . Le degré de dissociation est beaucoup plus bas que dans les mélanges  $N_2 / \text{Ar}$  (voir figure 4.3). La concentration de N est également plus basse que dans le mélange 4%  $N_2 / \text{Ar}$  ( $[N] = 5.1 \times 10^{14} \text{ cm}^{-3}$ ).

Dans les mélanges  $O_2 / N_2$  avec  $O_2$  de 2% à 20%, l'ajout de NO dans la post-décharge produit des variations linéaires de  $I_{NO_2^*}$  (voir figures 4.5 et 4.6) pour des valeurs de NO suffisamment faibles. Aux faibles pourcentages d' $O_2$ , l'arrivée de NO produit une extinction de la post-luminescence de  $NO\beta$ , produite par la variation (4.b).

Sur la figure 4.5, cette extinction se produit pour des valeurs de NO plus élevées que dans  $N_2$  pur aux faibles pourcentages d' $O_2$  (2% et 4%).  $[N]$  est donc égale à  $5.0 \times 10^{14} \text{ cm}^{-3}$  à 2% d' $O_2$ ,  $4.3 \times 10^{14} \text{ cm}^{-3}$  à 4%  $O_2$  et  $9.0 \times 10^{13} \text{ cm}^{-3}$  à 8% (figure 4.5).



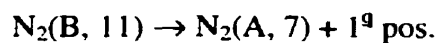


**Figure 4.6 :** Variation de  $I_{\text{NO}_2}$  en fonction du débit de Ar-1.3% NO dans une post-décharge  $\text{O}_2 / \text{N}_2$ .

Sur la figure 4.6, la concentration  $[\text{N}]$  est de  $(1.3-2.4) \times 10^4 \text{ cm}^{-3}$  à 10% d' $\text{O}_2$  et  $(4-4.5) \times 10^{13} \text{ cm}^{-3}$  à 16% d' $\text{O}_2$ .

Avec le mélange 20%  $\text{O}_2 / \text{N}_2$ , l'émission de  $\text{NO}_2(\text{A})$  apparaît sans l'ajout de NO. Il n'y a alors plus assez d'atomes d'azote. La molécule NO est produite à la suite du plasma et réagit avec l'oxygène atomique, suivant la réaction (4.c). L'ajout de NO a pour effet d'augmenter l'émission de  $\text{NO}_2(\text{A})$ , comme indiqué sur la figure 4.6.

La ré-association des atomes N se produit suivant la réaction :



L'intensité de la transition  $N_2(B, 11 - A, 7)$  à 580.4 nm caractérise ainsi la réaction (4.d):

$$I_{N_2} = K_{N_2} \cdot [N_2(B, 11)] \quad (4.11)$$

avec pour la densité de  $N_2(B, 11)$ , l'expression :

$$[N_2(B, 11)] = \frac{[N]^2 \cdot [M] \cdot k_d^M}{v_r^B + [M] \cdot k_Q^B} \quad (4.12)$$

Les valeurs de  $[M] \cdot k_Q^B$  sont reportés en [2]. Pour des pourcentages de NO ne dépassant pas 1%, la destruction de  $N_2(B)$  par NO peut être négligée et comme  $[M] \cdot k_Q^B > 10v_r^B$ , on peut écrire :

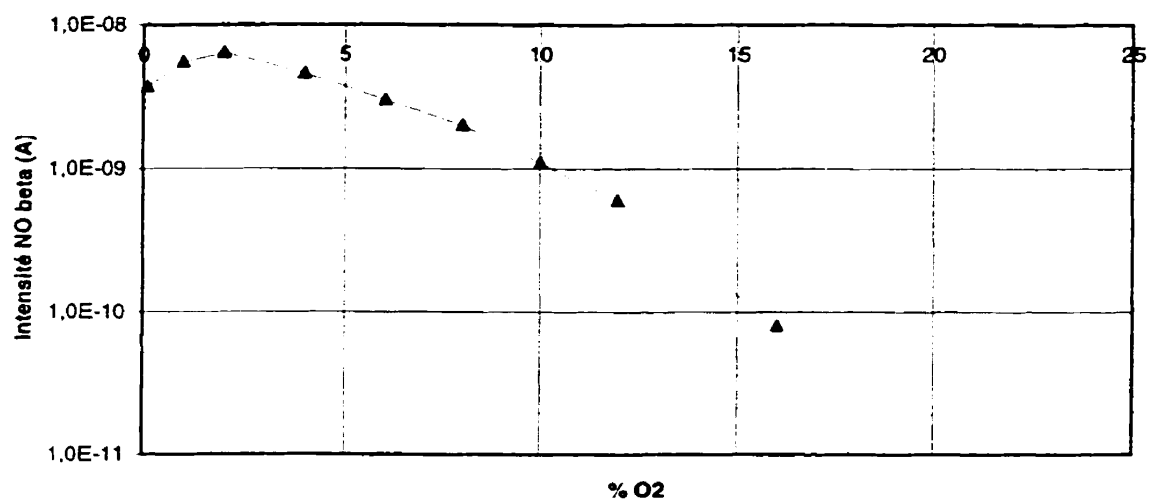
$$I_{N_2} = K_{N_2} \cdot \frac{k_d^{N_2} \cdot [N]^2}{k_{N_2}^B \cdot (1 + 2.2x)} \quad (4.13)$$

avec

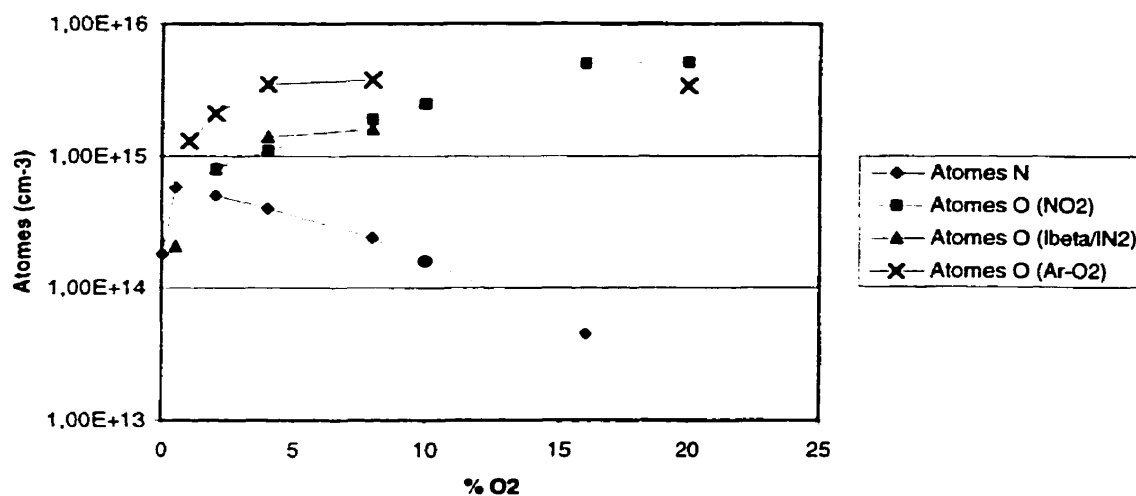
$$x = \frac{[O_2]}{[N_2]}$$

Les variations des intensités de  $N_2(B, 11 - A, 7)$  avec NO sont reportées sur la figure 4.7. Une croissance de l'intensité  $I_{N_2}$  est d'abord observée, soit de celle de  $[N]$ , comme trouvé par les points d'extinction  $Q_{NO}^{ext}$  des figures 4.5 et 4.6. L'équation (4.13) permet de suivre les valeurs de  $[N]$ , à partir de celles obtenues par le titrage de NO dans  $N_2$  pur.

Les valeurs trouvées sont reproduites sur la figure 4.8.



**Figure 4.7 :** Variations de l'intensité de NO<sub>beta</sub> en fonction du pourcentage d'oxygène dans une post-décharge O<sub>2</sub> / N<sub>2</sub>.



**Figure 4.8 :** Nombre d'atomes d'oxygène et d'azote présents dans la post-décharge mesurés par la méthode de titrage de NO.

Les pentes des variations  $I_{\text{NO}_2}$  avec NO sur les figures 4.5 et 4.6 permettent de déterminer les densités d'atomes d'oxygène à partir de l'équation (4.10). Les résultats sont reproduits sur la figure 4.8 par les carrés et les triangles.

L'intensité de  $\text{NO}_\beta$ , produite par le plasma  $\text{N}_2\text{-O}_2$  sans ajout de NO, est reportée sur la figure 4.7. L'apparition de  $\text{NO}_2(\text{A})$  se fait à la suite de la réaction (4.c) à partir de 18% d'oxygène (cf. figure 4.7).

En comparant les variations de  $I_{\text{NO}_2} = f([\text{NO}])$  sur la figure 4.6, on observe que l'intensité de  $\text{NO}_2(\text{A})$  pour 20%  $\text{O}_2$ , sans ajout de NO, est la même que celle à 16%  $\text{O}_2$ , avec un ajout de 0.6 sccm de NO, soit une densité de  $\text{NO} \sim 10^{14} \text{ cm}^{-3}$  pour une densité

d'oxygène atomique autour de  $5 \times 10^{15} \text{ cm}^{-3}$ . Il est alors possible d'estimer que, pour des pourcentages d' $\text{O}_2$  inférieurs à 16%, le plasma produit des quantités de  $\text{NO} < 10^{14} \text{ cm}^{-3}$ .

Sans ajout de  $\text{NO}$ , l'intensité des bandes de  $\text{NO}_\beta$  s'écrit :

$$I_{\text{NO}_\beta} = K_{\text{NO}_\beta} \cdot \frac{[N] \cdot [O] \cdot [M] \cdot k_b^M}{v_r^B + [M] \cdot k_Q^B} \quad (4.14)$$

Contrairement à l'équation (4.12),  $v_r^B$  n'est pas négligeable devant  $[M] \cdot k_Q^B$  dans l'équation (4.14).

À partir des valeurs de  $v_r^B$  et  $k_Q^B$  reproduites dans [2] :

$$v_r^B + [M] \cdot k_Q^B = 5.26 \times 10^5 \cdot (1 + 2.1x + 31.2y) \quad (4.15)$$

avec

$$x = \frac{[\text{O}_2]}{[\text{N}_2]} \quad \text{et} \quad y = \frac{[\text{NO}]}{[\text{N}_2]}$$

Pour  $y < 10^{-3}$ , le rapport  $I_{\text{NO}_\beta}/I_{\text{N}_2}$  s'écrit à partir des équations (4.13), (4.14) et (4.15)

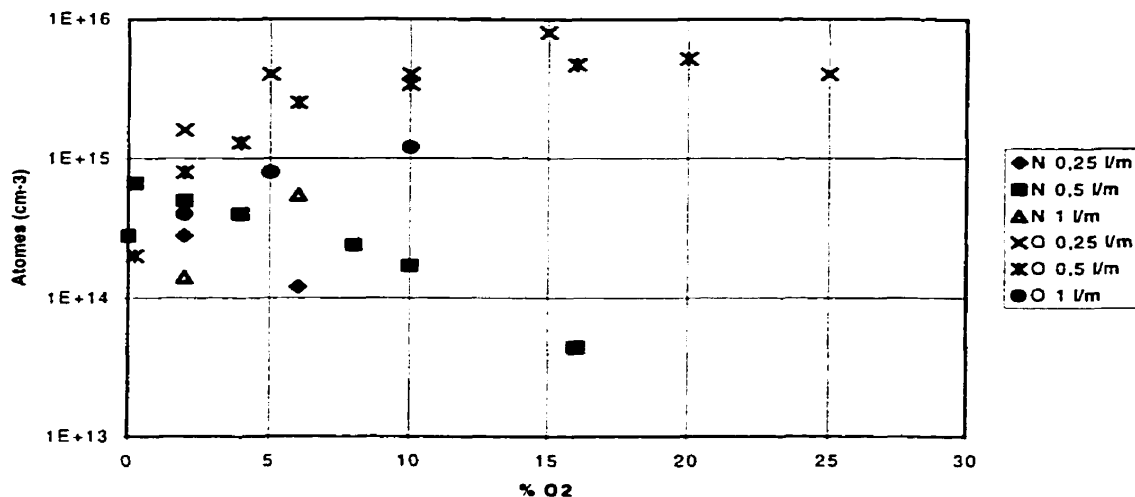
suivant :

$$\boxed{\frac{I_{\text{NO}_\beta}}{I_{\text{N}_2}} = \text{const} \cdot \frac{[O]}{[N]}} \quad (4.16)$$

L'équation (4.16) permet donc de suivre les densités  $[O]$  à partir de celles de  $[N]$ . En normalisant  $[O] = 8 \times 10^{14} \text{ cm}^{-3}$  pour 2%  $O_2$ , on trouve les valeurs de densités  $[O]$ , représentées par les triangles jaunes sur la figure 4.8.

Les densités d'atomes d'oxygène dans les mélanges  $O_2 / Ar$  sont reportées sur la figure 4.8. Aux faibles % d' $O_2$ , la production d'atomes est meilleure avec  $O_2 / Ar$  : un gain d'un facteur 4 avec 4%  $O_2$ . Aux forts % d' $O_2$ , on trouve sensiblement les mêmes valeurs. Les mélanges  $O_2 / N_2$  apportent l'émission de  $NO_\beta$  qui produit des bandes intenses entre 250 et 400 nm. Ces bandes sont intenses aux faibles % d' $O_2$  (< 10%).

En faisant varier le débit de gaz à pression fixe (2.3 Torr, pompe primaire), dans le mélange  $N_2-O_2$ , une augmentation des densités d'oxygène est constatée à 250 sccm (figure 4.9) et une diminution à 1000 SCCM. Les bandes  $NO_\beta$  sont maximums à 1% - 2%  $O_2$  ( $8 \text{ à } 9 \times 10^{-8} \text{ A}$ ) et décroissent rapidement ( $3 \times 10^{-10} \text{ A}$  à 10%  $O_2$ ) au faible débit de 250 sccm. Elles sont moins intenses à  $Q = 1000 \text{ sccm}$ .



**Figure 4.9 :** Variation du nombre d'atomes d'azote et d'oxygène en fonction du % d'O<sub>2</sub> dans une post-décharge O<sub>2</sub> / N<sub>2</sub>.

Des essais ont ainsi été réalisés à plus grande vitesse de pompage (primaire + roots), à pression plus faible (1.4 Torr) et des débits de 1000 et 2000 sccm. Dans ce cas, le % d'O<sub>2</sub> ne dépasse pas 10%. Au débit de 1000 sccm, les mêmes valeurs que précédemment (primaire seule,  $p = 2.3$  Torr) sont retrouvées. Au débit de 2000 sccm, le % d'O<sub>2</sub> est inférieur à 5%. Les densités [N] et [O] et les émissions de NO <sub>$\beta$</sub>  sont plus faibles.

Les meilleures conditions sont ainsi celles à 2.3 Torr (pompe primaire seule), aux débits de 250 sccm et 500 sccm. Avec 2% O<sub>2</sub> dans N<sub>2</sub>, l'émission UV de NO <sub>$\beta$</sub>  est à son maximum, les atomes d'oxygène sont présents avec une densité d'environ  $10^{15}$  cm<sup>-3</sup>. Avec 10% à 20% O<sub>2</sub> dans N<sub>2</sub>, l'intensité de NO <sub>$\beta$</sub>  diminue d'un facteur 10 environ et la

densité d'atomes O augmente d'un facteur 5. Avec (10% - 20%) O<sub>2</sub> / N<sub>2</sub> des conditions voisines de (4% - 10%) O<sub>2</sub> / Ar sont retrouvées : concentration de O entre 4 et  $5 \times 10^{15} \text{ cm}^{-3}$  et absence d'émission UV de NO<sub>β</sub>.

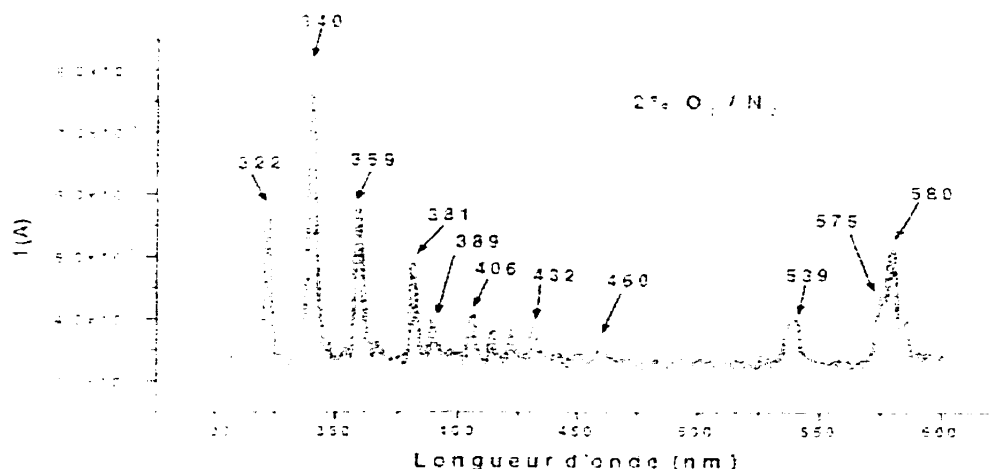
Ainsi, deux conditions de traitement semblent intéressantes aux débits de 250 sccm et 500 sccm (2.3 Torr – 100 W) :

- 1) Mélange 2% O<sub>2</sub> / N<sub>2</sub> pour l'émission UV de NO<sub>β</sub> et des concentrations moyennes en atomes d'oxygène;
- 2) Mélange (10% - 20%) O<sub>2</sub> / N<sub>2</sub> ou (4% - 10%) O<sub>2</sub> / Ar pour de fortes densités d'atomes d'oxygène sans les UV de NO<sub>β</sub>.



### ***4.3 Titrage par $\text{NO}$ : principaux résultats appliqués à la stérilisation par plasma en post-décharge***

Dans la section précédente, les résultats préliminaires et les principes généraux de la spectroscopie par titrage de  $\text{NO}$  furent présentés. Dans la présente partie du travail, les résultats trouvés pour les applications de la stérilisation par plasma différé seront montrés. Tout d'abord, il faut mentionner que lors de ces acquisitions spectrales, une des plus importantes découvertes du présent projet fut faite : l'observation des molécules  $\text{NO}_\beta$  émettrices de photons UV (250 à 400 nm) pour un mélange  $\text{O}_2 / \text{N}_2$ . La figure 4.10 ci-dessous montre quelques raies principales observées dans le système  $\beta$  de la molécule d'oxyde nitrique.



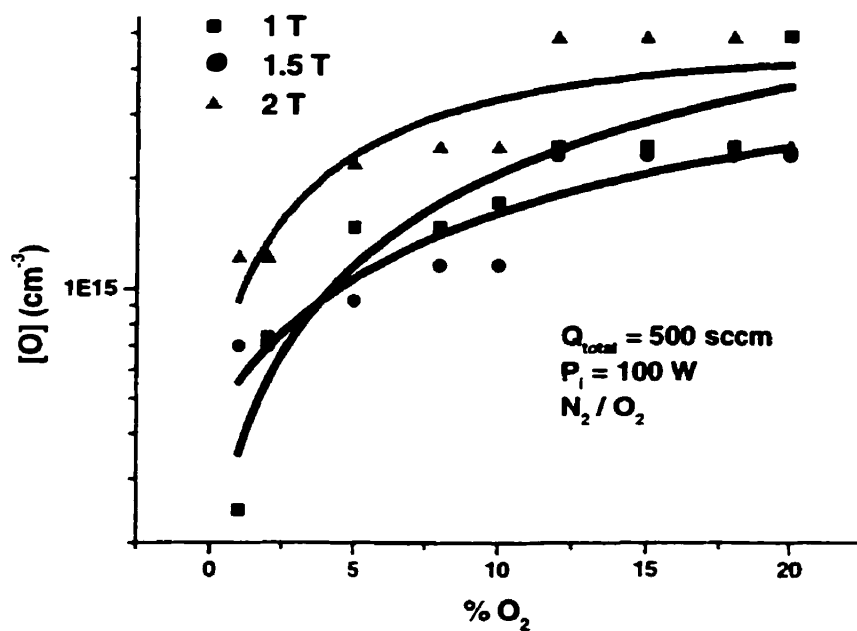
**Figure 4.10 :** Spectre d'une post-décharge (2%  $O_2$  /  $N_2$ ) et identification de certaines raies de  $NO_B$  (par exemple : 322 =  $NO(0-8)$ , 340 =  $NO(0-9)$ , 359 =  $NO(0-10)$ , 381 =  $NO(0-11)$  et 580 =  $N_2(B, 11-7)$ ).

#### **4.3.1 Mesure de la concentration en oxygène atomique**

Telle que montrée dans la première partie de ce chapitre, la concentration d'oxygène atomique dans des mélanges  $x\%$   $O_2$  dans Ar et  $N_2$  fut calculée à trois pressions différentes : 1, 1.5 et 2 Torr. Ces mesures ont été effectuées toujours en ayant dans l'esprit d'optimiser le procédé de stérilisation. Les résultats obtenus pour une enceinte de Pyrex sont montrés sur la figure 4.11.

Le débit de gaz utilisé pour faire ces expériences étaient de 500 sccm. D'autres mesures furent effectuées en utilisant un débit de gaz plus élevé (1000 sccm) mais la concentration d'oxygène atomique était deux fois moindre qu'à 500 sccm. Des résultats semblables furent également observés dans un mélange  $O_2$  / Ar. Premières observations : il semble y avoir saturation

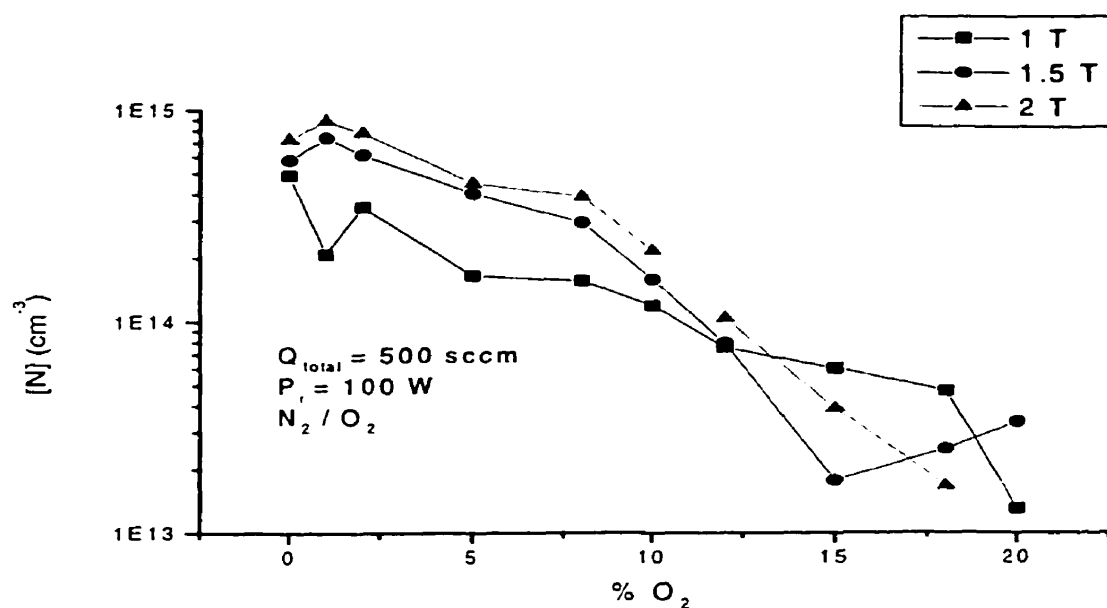
d'oxygène atomique à partir de 12%  $O_2$  dans l'azote. De plus, la concentration maximale d'oxygène atomique est observée à une pression de 2 Torr.



**Figure 4.11 :** Concentration d'oxygène atomique à trois pressions différentes dans une enceinte de Pyrex pour un mélange  $O_2 / N_2$ .

### 4.3.2 Mesure de la concentration en azote atomique

Le même genre d'analyse spectroscopique fut effectué pour quantifier la densité d'azote atomique retrouvée dans un mélange  $O_2 / N_2$ . Les résultats sont montrés sur la figure 4.12 ci-dessous toujours pour une enceinte de Pyrex.

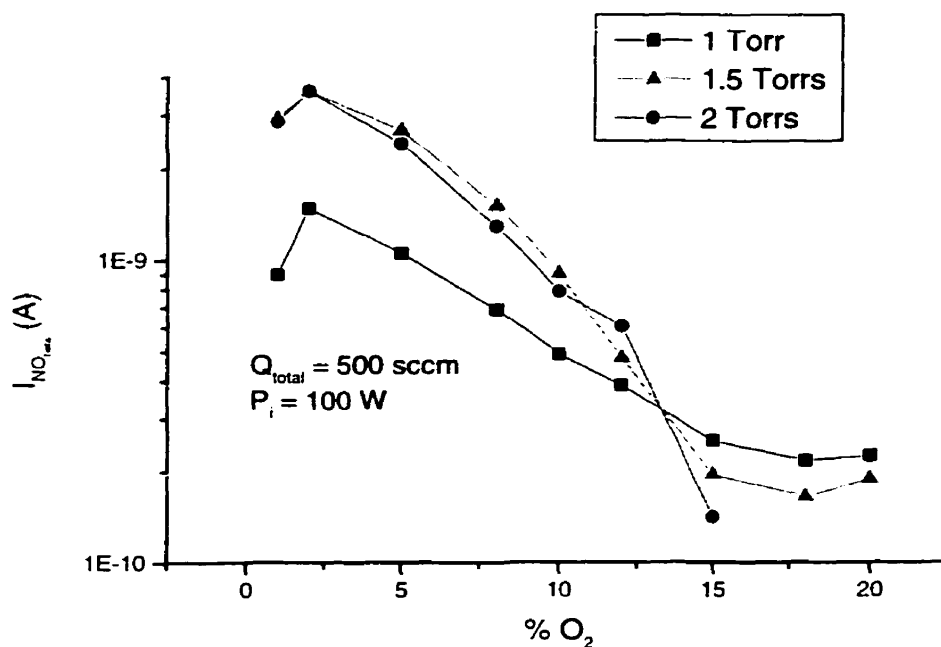


**Figure 4.12 :** Concentration d'azote atomique à trois pressions différentes dans une enceinte de Pyrex pour un mélange  $O_2 / N_2$ .

À la lumière de la figure précédente, il semble bien que la concentration maximale de  $[N]$  soit observée à une pression de 2 Torr et à un débit de 500 sccm. De plus, cette valeur optimale se retrouve aux très faibles pourcentages d'oxygène dans l'azote.

#### ***4.3.3 Émission $NO_\beta$***

L'observation d'une molécule émettrice dans la région ultraviolette du spectre électromagnétique s'avère être une partie fondamentale dans le cheminement d'une compréhension plus grande des mécanismes de destruction des spores bactériennes par le plasma différé. Dans le but d'optimiser le procédé, différentes mesures d'intensité de cette molécule (oxyde nitrique dans le système bêta) furent prises. Les résultats sont montrés sur la figure suivante.

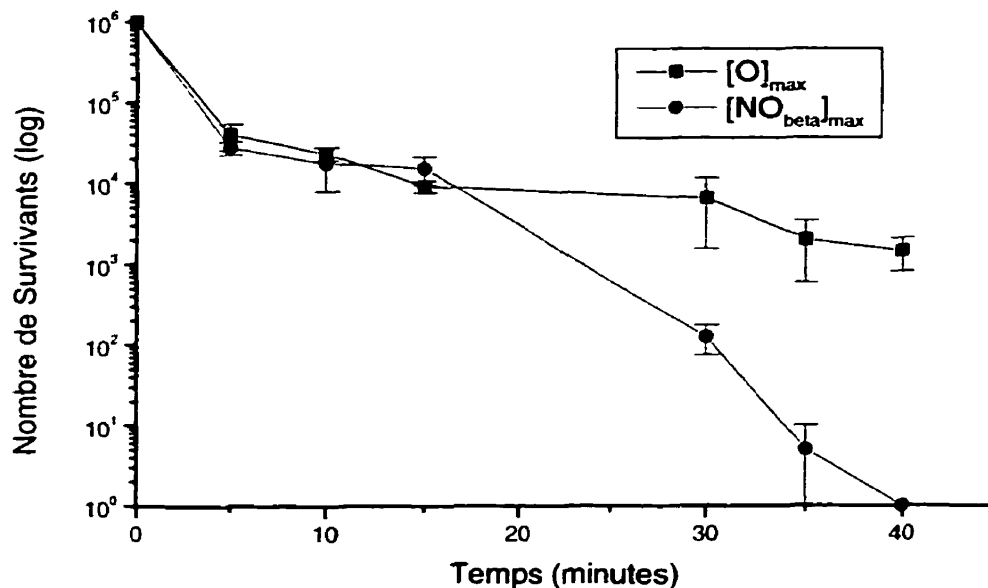


**Figure 4.13** : Intensité de l'émission  $NO_{\beta}$  dans un mélange  $O_2 / N_2$ . Débit : 500 sccm.

Première observation importante : le maximum d'émission UV se situe à 2%  $O_2 / N_2$ , ce qui semble également correspondre au même pourcentage d'oxygène pour avoir la densité maximale d'azote atomique.

#### ***4.3.4 Influence de l'oxygène atomique vs. le rayonnement UV de la post-décharge sur l'efficacité du procédé de stérilisation***

Grâce aux observations précédentes, les principaux éléments caractérisant la post-décharge d'un mélange  $O_2 / N_2$  ont été identifiés. En optimisant l'une ou l'autre des espèces présentes dans le plasma différé et en vérifiant chacune de ces optimisations sur l'efficacité de la destruction des spores bactériennes, il sera alors possible de vérifier leur influence respective. Ces résultats permettront de mieux comprendre les mécanismes d'action prenant place entre les espèces actives de la post-décharge et les spores. Tout d'abord, quels rôles jouent l'oxygène atomique et les UV respectivement? Les résultats suivants montrent l'effet des deux constituants mentionnés ci-haut sur l'efficacité de la stérilisation pour des conditions opératoires identiques (figure 4.14).



**Figure 4.14 :** Effet respectif du maximum  $[O]$  (15%  $O_2 / N_2$ ) et du maximum  $I_{UV}$  (2%  $O_2 / N_2$ ).

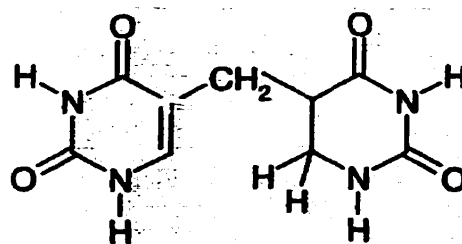
Il est évident, à la lumière de la dernière figure, que l'émission ultraviolette joue un rôle prédominant dans la stérilisation par plasma différé. D'ailleurs, à 2%  $O_2$  dans  $N_2$ , il y a 20 fois moins d'atomes d'oxygène qu'à 15%  $O_2$  et une intensité UV 10 fois plus grande. Les UV des molécules NO jouent sans contredit un rôle non négligeable et l'optimisation du procédé passe inévitablement par la formation optimale de ces molécules. Par contre, il est important de souligner que les atomes d'oxygène ne sont pas pour autant inutiles, au contraire.



#### ***4.4 Titrage par $\text{NO}$ : principales discussions appliquées à la stérilisation par plasma en post-décharge***

Différents mécanismes de destruction pourraient être proposés pour expliquer l'efficacité du procédé lors de l'optimisation de l'émission  $\text{NO}_\beta$ . Par contre, certains mécanismes s'avèrent être plus intéressants que d'autres puisqu'il s'agit d'analogies avec les mécanismes proposés pour les lampes germicides ainsi que pour la détérioration de certains polymères par l'irradiation ultraviolette.

Une des raisons expliquant l'efficacité du procédé lorsque l'émission UV est optimisée est le fait que les UV atteignant la spore bactérienne réussissent à pénétrer jusqu'à l'ADN sporal et parviennent à réagir avec les substances composant le matériel génétique pour former des photoproduits. Ces photoproduits ont été grandement étudiés et ils sont connus sous le nom de 5 - thymine - 5,6 - dihydrothymine (TDHT). Une fois ce produit de réaction formé, il s'incorpore dans l'ADN sporal et s'accumule lorsque l'exposition de la spore aux UV perdure, la mort s'ensuit. En effet, le TDHT est nocif en grande quantité pour une grande variété de spore bactérienne [4]. La figure 4.15 illustre la structure chimique du TDHT, toujours selon [4].



**Figure 4.15** : Structure du TDHT.

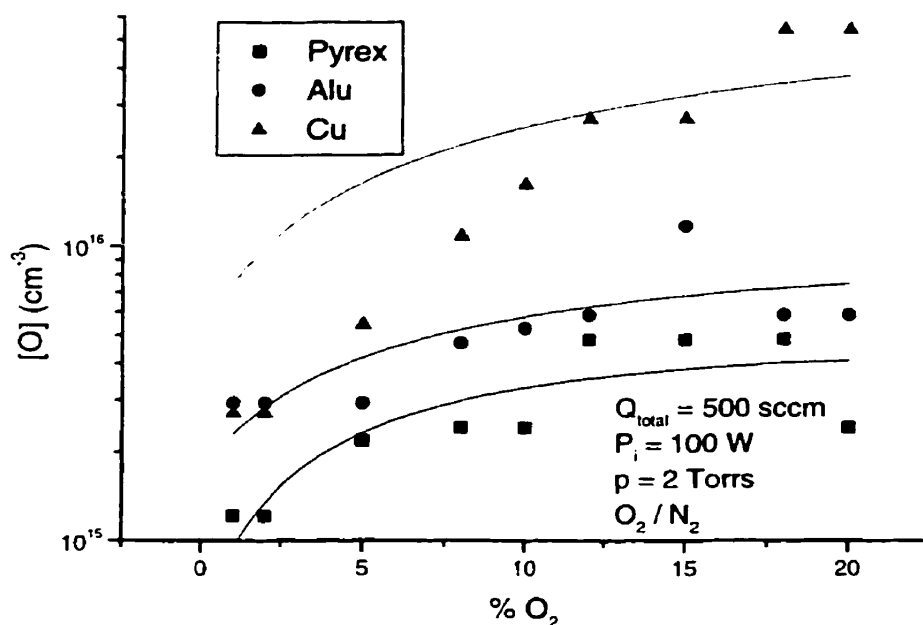
Une autre possibilité peut être avancée en comparant la spore bactérienne à un polymère. En effet, il est bien connu que lorsqu'un polymère est soumis aux radiations UV, il se produit une réticulation en surface. Cette réticulation est souvent accompagnée d'une scission des chaînes carbonées ce qui augmente la réactivité des espèces actives de la zone de post-décharge [5]. En appliquant ce modèle à la spore bactérienne soumise à un traitement de plasma en post-décharge, il est possible de faire l'hypothèse suivante : les UV de la post-décharge augmentent la réactivité de l'oxygène atomique en brisant les liens C – C de l'ADN et des membranes protectrices de la spore. De façon générale, les radiations UV augmentent les cinétiques de réaction entre les espèces actives du plasma post-décharge et les spores bactériennes. Ces dernières suppositions semblent logiques et expliquent très bien les différents mécanismes pouvant prendre place lors d'un traitement optimisé pour l'irradiation ultraviolette.

#### ***4.5 Titrage par no : principaux résultats pour les matériaux constituant l'enceinte de traitement***

Une autre partie de ce projet consistait à mesurer les pertes des différentes espèces actives du plasma différé sur des enceintes recouvertes de Pyrex, d'aluminium et de cuivre. Ces mesures ont permis de voir si la nature des parois pouvait avoir un impact quelconque sur l'efficacité de la stérilisation. Ce détail peut sembler anodin au départ, mais il s'est avéré qu'effectivement la nature des parois avait une influence non négligeable sur l'optimisation du procédé.

##### ***4.5.1 Perte de l'oxygène atomique sur des parois de natures différentes***

Cette section relate les résultats obtenus par titrage de NO sur la concentration d'oxygène atomique dans différentes enceintes de traitement pour des mélanges  $x\%$   $O_2$  /  $N_2$  ( $x \leq 20\%$ ). Les résultats obtenus sont illustrés sur la figure 4.16.

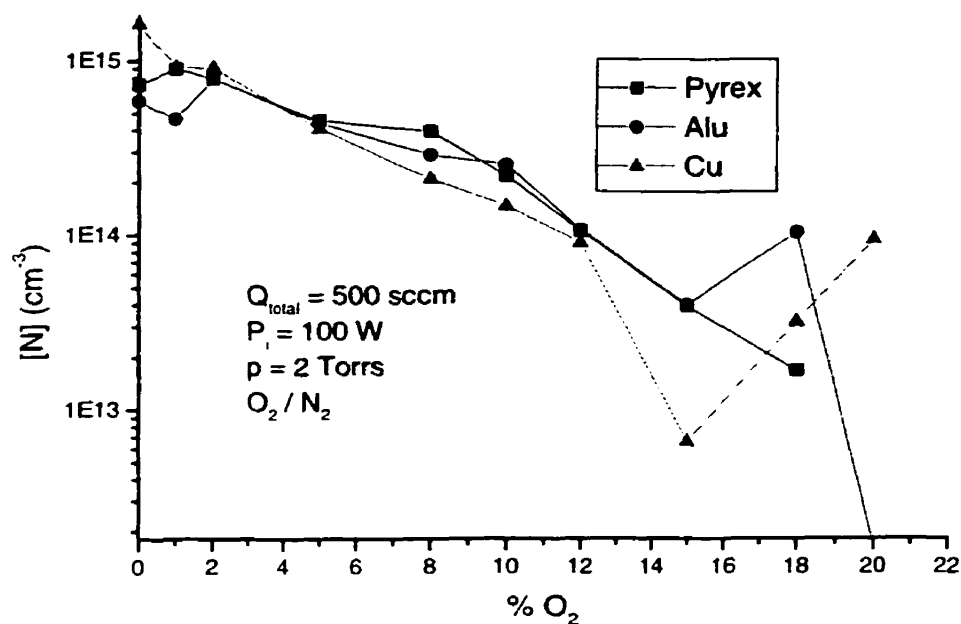


**Figure 4.16 :** Concentration d'oxygène atomique dans des parois de traitement de natures différentes (Pyrex, aluminium et cuivre).

En regardant la figure précédente, il est clair que pour optimiser la concentration d'oxygène atomique pour la stérilisation par plasma différé, le réacteur de cuivre semble être le plus approprié.

#### **4.5.2 Perte de l'azote atomique sur des parois de natures différentes**

Cette section relate les résultats obtenus par titrage de NO sur la concentration d'azote atomique dans différentes enceintes de traitement pour des mélanges  $x\% O_2 / N_2$  ( $x \leq 20\%$ ). Sur la figure 4.17, les concentrations d'azote atomique sont montrées pour les mêmes enceintes que ci-dessus.



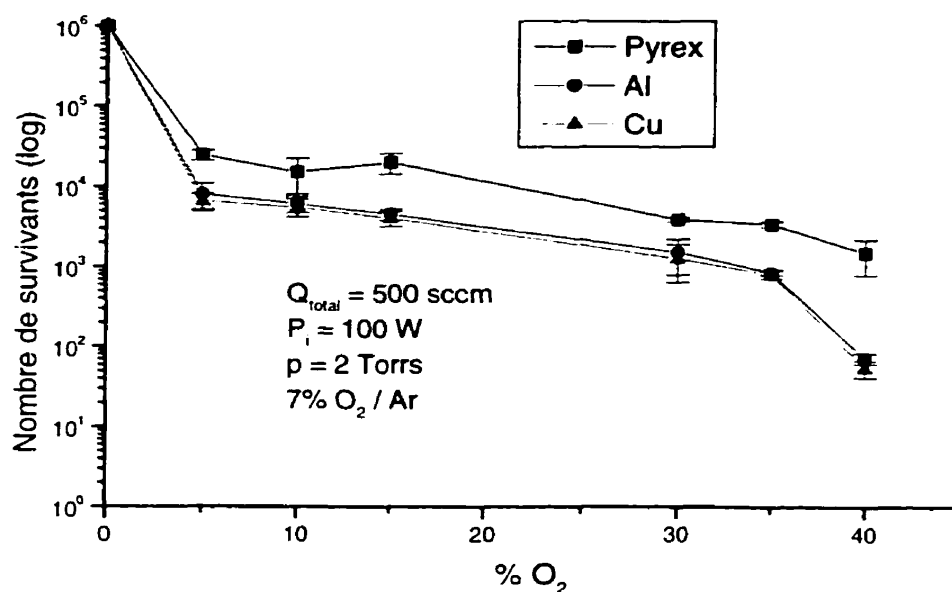
**Figure 4.17 :** Concentration d'azote atomique dans des parois de traitement de natures différentes (Pyrex, aluminium et cuivre).

La figure ci-dessus illustre très bien que la concentration d'azote atomique n'est pas influencée par la nature des parois du réacteur de traitement contrairement au cas de l'oxygène atomique. Ce résultat laisse supposer que la formation de  $NO_\beta$  sera nécessairement influencée par le matériau constituant l'enceinte pour les conditions opératoires utilisées puisque l'oxygène atomique l'est. Il faut préciser par contre que le fini de surface de chacun des matériaux n'était pas le même. Il faudrait alors faire des essais avec des parois ayant subi les mêmes procédés de fabrication et ayant les mêmes finis de surface.

### 4.5.3 Influence des parois sur l'efficacité de la stérilisation

Sachant maintenant que le cuivre semble être le matériau le plus approprié pour faire de la stérilisation par plasma différé, il est important de vérifier ce que l'augmentation de la concentration d'oxygène atomique peut avoir comme impact sur l'efficacité du procédé.

La figure 4.18 illustre les résultats obtenus dans un mélange 7% O<sub>2</sub> / Ar.



**Figure 4.18 :** Effet de la nature des parois sur l'efficacité de la stérilisation.

Cette dernière figure montre bien que le fait d'augmenter la concentration d'oxygène atomique dans l'enceinte de traitement semble avoir un effet non négligeable sur le procédé. Par contre, il faut noter que même s'il y a beaucoup d'oxygène atomique dans une enceinte de cuivre, l'efficacité est à peine améliorée, laissant présager qu'il y a un optimum d'oxygène atomique et qu'une augmentation de cette concentration n'aura

aucun effet important ou presque. Ce dernier point amène donc l'aspect d'une densité critique d'oxygène dans l'enceinte de post-décharge. Une surabondance d'O atomique entraînera inéluctablement une oxydation précoce des biomatériaux, ce qui n'est pas très attrayant comme nouveau procédé. C'est pourquoi tout doit être mis en œuvre afin d'optimiser la formation de molécules émettrices d'UV tout en diminuant au maximum la quantité d'oxygène introduite permettant ainsi de conserver la biofonctionnalité des matériaux ainsi que leur intégrité physico-chimique.

#### 4.6 Références

1. RICARD, A. (1995). Chimiluminescence, Plasmas Réactifs. Société Française du Vide, Paris, 102-104.
2. MOREAU, S., TABRIZIAN, M., MOISAN, M., BARBEAU, J. and YAHIA, L'H. (1999). Study of the Influence of Gas Plasma Afterglow Operating Conditions on the Efficacy of Destruction of *Bacillus subtilis* Spores, Submitted.
3. CZERWIEC, T., GAVILLET, J., BELMONTE, T., MICHEL, H. et RICARD, A. (1996). Determination of N and O Atom Density in Ar-N<sub>2</sub>-H<sub>2</sub> and Ar-O<sub>2</sub>-H<sub>2</sub> Flowing Microwave Post Discharges, J. Phys. III, **6**, 1205-1212.
4. RUSSELL, A.D. (1993). Theoretical Aspects of Microbial Inactivation. Sterilization Technology : A practical guide for manufacturers and users of health care products, R.F. Morrissey & G. Briggs Phillips éd., Van Nostrand Reinhold, New York, 120-151.
5. PONCIN-ÉFAILLARD, F., BROSSE, J.C. et FALHER, T. (1997). Postgrafting of N-vinyl-2-pyrrolidone onto a plasma modified polypropylene surface. Macromol. Chem. Phys., **199** : **8**, 1613-1621.



## ***CHAPITRE 5 – DISCUSSION GÉNÉRALE***

---

Dans les chapitres précédents, il a été montré que la stérilisation par plasma différé peut être effective seulement dans certaines conditions opératoires particulières. Ces conditions sont très variées et comprennent le débit de gaz, la pression à l'intérieur de l'enceinte de traitement, la nature du mélange gazeux utilisé, la densité de puissance transmise aux gaz précurseurs, la configuration de l'appareil, etc. Chacune de ces dernières conditions doit être prise en compte afin d'optimiser la durée de traitement pour atteindre le niveau d'assurance sécuritaire de  $10^{-6}$  en un temps minimal.

Premièrement, il est important de rappeler que le fait de mettre les spores bactériennes sous vide (environ 2 Torr) et de faire circuler un gaz sans formation du plasma n'entraîne aucun effet destructif sur ces micro-organismes. Cette étape fut réalisée dans le but de s'assurer que l'effet de destruction relié à un traitement au plasma était définitivement causé par les espèces actives du plasma en post-décharge. Il faut également spécifier que les essais sur les indicateurs biologiques commerciaux ont été effectués sans aucun matériel d'emballage pour faciliter l'analyse et l'accessibilité des spores pour les espèces actives du plasma différé. Par contre, comme l'efficacité du procédé est directement reliée au nombre d'espèces actives du plasma atteignant les spores bactériennes, le temps de traitement pour atteindre la stérilisation complète d'un échantillon ou d'une surface emballée sera légèrement plus long permettant ainsi à un nombre donné de particules d'atteindre l'item emballé. De plus, comme les mécanismes

de perte des espèces actives sur les matériaux d'emballage ne sont pas connus, peut-être que le temps de traitement sera beaucoup plus long qu'imaginé en premier lieu. Des études sur ce sujet devront le démontrer.

Toutes les expériences effectuées dans les deux prototypes, celui utilisant un surfatron et l'autre un surfatron-guide, n'ont jamais dépassé la température de 50°C.

Grâce aux premiers essais réalisés sur des indicateurs commerciaux, il a été démontré qu'effectivement le plasma en post-décharge peut être utilisé comme agent stérilisant. Cette dernière affirmation permet donc le développement d'un prototype éventuellement commercialisable dont les conditions opératoires devront respecter certains paramètres d'utilisation afin d'obtenir les résultats souhaités.

### *5.1 Mélange gazeux*

Ce premier paramètre s'est avéré le plus important car c'est lui qui déterminera quelles espèces seront formées lors de l'allumage du plasma. Un choix judicieux de gaz permet d'obtenir un premier paramètre menant à l'efficacité du procédé. À la lumière des résultats présentés dans ce mémoire, le gaz fondamental s'est avéré être l'oxygène. De l'oxygène doit donc être ajouté à un gaz porteur pour obtenir suffisamment d'oxygène atomique capable d'attaquer les membranes sporales pour ensuite, après réaction avec les tuniques, former des produits volatiles comme le gaz carbonique, le monoxyde de

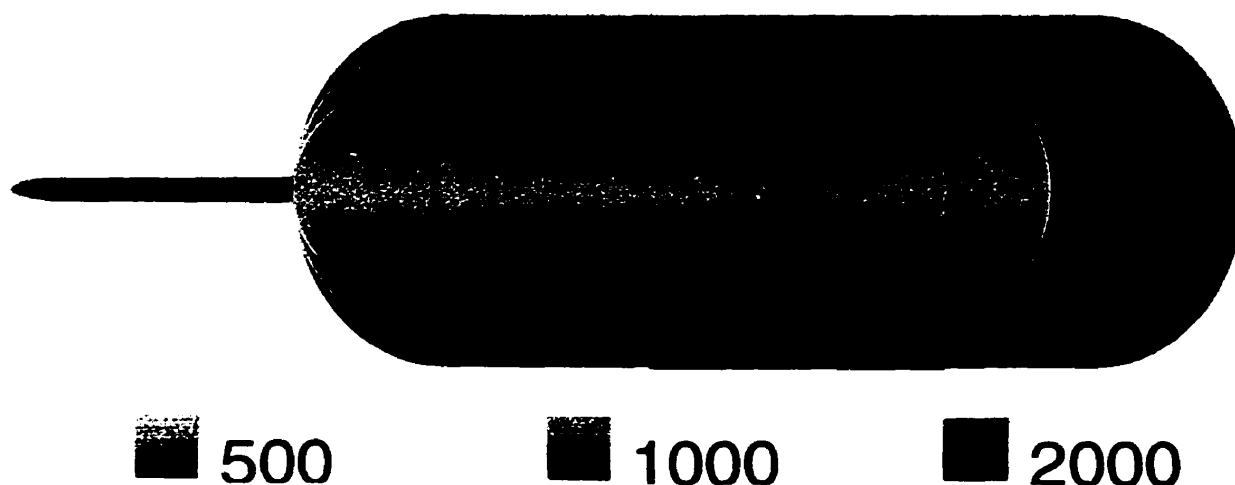
carbone ou encore de la vapeur d'eau. L'ajout d'oxygène moléculaire doit se faire selon certaines règles : tout d'abord, il est important d'injecter seulement un faible pourcentage afin de favoriser la dissociation des espèces et l'ajout d'une faible quantité permettra également l'optimisation de l'émission UV pour un mélange  $O_2 / N_2$ . De plus, ceci a l'avantage de réduire au maximum l'oxydation précoce des biomatériaux après un traitement au plasma différé. Des gaz comme l'argon ou l'azote seul se sont avérés inefficaces pour la stérilisation à cause de leur inertie réactionnelle vis-à-vis les spores bactériennes. Bien qu'une destruction de 2 décades fut observée dans les deux cas pour des temps de traitement de 40 minutes, l'effet destructeur fut relié à d'autres mécanismes qui ne sont pas encore bien compris. Par exemple, quel est le rôle des UV dans ces post-décharges lorsqu'il y a absence d'oxygène? Quel est le rôle joué par l'oxygène moléculaire adsorbé sur les parois du réacteur lors de la remise sous vide et de l'allumage du plasma? Est-ce qu'il y a deux groupes de spores bactériennes : un mutant plus résistant aux espèces actives du plasma en post-décharge et un autre normal plus faible? Toutes ces questions sont donc demeurées sans réponse pour l'instant. Des études plus approfondies permettront d'élucider ces questions.

Une autre observation intéressante lors de l'utilisation de l'oxygène moléculaire dans un mélange gazeux est la possible formation d'ozone. Bien que l'ozone soit instable dans ces domaines de pression (1 à 7 Torr), il est fort possible qu'il en reste des traces et que cette quantité infime puisse tout de même jouer un rôle non négligeable dans les processus de destruction. De plus, ces mélanges oxygénés peuvent favoriser la

formation d'espèces comme NO, NO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O, <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, etc. (dans le cas des mélanges O<sub>2</sub> / N<sub>2</sub>) qui sont des espèces ayant certaines propriétés bactéricides intéressantes pouvant dénaturer l'ADN sporal, pouvant également oxyder certaines protéines cellulaires et pouvant également peroxyder certains lipides. À la conclusion de l'étude sur ce paramètre, il apparaît le premier point fondamental dans l'obtention de la stérilisation complète des échantillons : l'oxygène.

### ***5.2 Débit vs. pression de gaz***

Deux paramètres indissociables furent également étudiés : le débit et la pression de gaz dans l'enceinte de traitement. Un des premiers problèmes soulevés lors des essais préliminaires fut la dépendance de la position de l'échantillon dans la chambre de post-décharge sur l'efficacité de la stérilisation. Ce point soulevait donc la nécessité d'uniformiser la distribution des espèces actives du plasma différé dans la l'enceinte de stérilisation. Cette uniformisation passait inéluctablement par l'optimisation du débit de gaz et par un choix judicieux de pression. Comme ces paramètres sont indissociables, il est important de les traiter séparément. Tout d'abord, pour une pression donnée, l'uniformisation des espèces actives passe par l'optimisation du débit. Comme illustré sur la figure 4.1, plus le débit sera augmenté, plus les espèces seront distribuées uniformément dans tout le volume et plus elles auront la chance d'atteindre leurs cibles : les spores bactériennes.



**Figure 5.1 :** Distribution des espèces actives de la post-décharge pour une pression donnée pour différents débits de gaz.

Maintenant, si le débit est maintenu constant, la pression devient un paramètre jouant un rôle fondamental dans l'uniformisation de la distribution des espèces. Le fait de diminuer la pression dans le réacteur, pour un certain débit, permet d'augmenter la durée de vie des différentes espèces en diminuant le taux de collision des particules. La désorption des espèces adsorbées sur les parois lors de la remise à la pression atmosphérique s'effectuera de façon plus efficace, contribuant ainsi à la destruction des spores bactériennes. Par le fait même, la distribution des particules excitées sera d'autant plus efficace que la pression dans l'enceinte sera basse. Par contre, le fait de diminuer ainsi la pression pour un débit donné diminuera la concentration des espèces dans le volume de traitement, d'où la nécessité d'augmenter le débit de gaz pour contrer ce problème. Ce dernier point amène donc la notion de densité critique d'espèces actives du plasma en post-décharge pour obtenir la stérilisation complète d'un certain

échantillon. Cette densité n'a pas été mesurée et une caractérisation plus approfondie de la post-décharge permettra de répondre à cette question et de régler le dilemme existant entre le débit et la pression.

### ***5.3 Température du substrat***

Un autre paramètre important qui fut examiné est l'influence de la température du substrat sur l'efficacité du procédé. En effet, comme mentionné dans l'article numéro 2, la température peut avoir plusieurs effets contraires dans les différentes étapes de destruction des spores bactériennes par les espèces du plasma différé. Ces étapes sont l'adsorption, la réaction et la désorption de ces particules sous forme de produits volatiles. L'optimisation de la température peut donc se faire pour une de ces étapes à la fois et non les trois en même temps. En effet, pour une destruction efficace, il doit y avoir un temps d'adsorption relativement long et des temps de réaction et de désorption plutôt courts. Comme c'est la même équation qui régit chacune de ces étapes, il est difficile d'obtenir un ordre de grandeur optimal de température permettant une destruction efficace. C'est pour cette principale raison que la température du substrat doit être optimisée de façon à ne pas nuire à chacune des différentes étapes permettant l'élimination rapide des spores bactériennes.

#### ***5.4 Diamètre du tube à décharge***

Un facteur qui peut sembler anodin à première vue est le diamètre du tube à décharge. En effet, il a été vérifié que la vitesse d'écoulement des particules dans l'enceinte de traitement avait un effet non négligeable sur l'efficacité du procédé de stérilisation. Ces effets sont principalement causés par le fait que les espèces, ayant une plus grande vitesse, peuvent atteindre les spores plus rapidement que d'autres plus lentes. De plus, plus les vitesses d'écoulement seront grandes, plus grand sera le nombre d'espèces encore excitées lors de la collision avec les spores bactériennes, d'où une plus grande efficacité du traitement. Pour augmenter cette vitesse d'écoulement, il est important de diminuer le diamètre du tube à décharge.

#### ***5.5 Caractérisation de la post-décharge par spectroscopie d'émission optique : titrage par NO***

Un des points important de ce projet fut la caractérisation de la post-décharge par titrage de NO. En effet, sans cette caractérisation, les mécanismes de destruction des spores bactériennes proposés ici ne seraient pas aussi complets que présentement. Cette méthode spectroscopique a permis, entre autre, d'identifier les molécules NO<sub>β</sub> émettrices dans la région ultraviolette du spectre électromagnétique ainsi que la quantification des atomes d'azote atomique et d'oxygène atomique respectivement. De même, une

corrélation entre l'oxygène atomique et l'émission UV put être effectuée afin d'expliquer les différentes étapes de destruction des micro-organismes.

### ***5.5.1 Observations découlant de l'étude spectroscopique***

Plusieurs données découlèrent des résultats obtenus lors des analyses spectroscopiques. Tout d'abord, la possibilité de quantifier les concentrations de N et O et ensuite, l'identification des molécules NO dans le système  $\beta$ . Ces mesures permirent donc de poser l'hypothèse de la synergie entre O atomique et NO $\beta$ . Première étape de destruction proposée : combustion lente des membranes sporales par O atomique suivie de la formation de produits volatiles comme le gaz carbonique ou la vapeur d'eau. Ensuite, deuxième étape, destruction de l'ADN sporal, une fois les tuniques ouvertes par O, par les molécules émettrices UV par la formation d'un produit toxique qui s'insère dans la chaîne d'acide nucléique des spores bactériennes. Ce produit est connu sous le nom de TDHT et est très nocif pour les micro-organismes. De plus, le rayonnement UV émis par les molécules NO accélère les cinétiques de réaction en brisant les liens C-C à l'intérieur même des membranes cellulaire. Une fois ces liens brisés, il est plus facile pour les différentes espèces actives du plasma différé de réagir et de détruire les tuniques. Ces phénomènes sont donc reliés à la synergie existante entre ces deux espèces principalement : O atomique et NO $\beta$ . Par contre, le taux de formation de NO $\beta$  peut dépendre de plusieurs paramètres dont la concentration de N atomique. Certaines hypothèses comme cette dernière devront être vérifiées par différentes méthodes



d'analyse. Jusqu'à ce jour, l'optimisation du rayonnement UV par les molécules  $\text{NO}_\beta$  s'est avérée être le traitement le plus prometteur en terme d'efficacité de la stérilisation par plasma en post-décharge.

### ***5.6 Nature des parois***

Le matériau constituant l'enceinte de traitement fut également l'objet d'une étude spectroscopique afin d'arriver à déterminer si les différents mécanismes de perte des espèces actives pouvaient avoir un effet quelconque sur l'efficacité du procédé. Une différence importante de concentration d'oxygène atomique fut observée dans des enceintes de Pyrex, d'aluminium et de cuivre. Cependant, aucune différence ne fut observée pour les densités d'azote atomique laissant présager que les parois influencent différemment certaines espèces de la post-décharge. De plus, les essais de stérilisation effectués aux concentrations maximales d'oxygène atomique (enceinte de cuivre) se sont avérés plus efficaces que les autres (Pyrex et aluminium). Encore une fois, ce point montre que l'oxygène atomique est un atout essentiel dans la stérilisation par plasma. Il faut également ajouter que les finis de surface de chacun des matériaux constituant l'enceinte de traitement n'étaient pas les mêmes et que leurs procédés de fabrication différaient aussi. Par le fait même, une étude plus approfondie devra être effectuée avec des matériaux ayant subi les mêmes traitements afin de vraiment pouvoir les comparer entre eux. Par contre, ces essais préliminaires indiquent clairement le rôle important de la composition des parois de l'enceinte de traitement. Les mécanismes de perte peuvent

être influencés par la densité de la surface, la stabilité des oxydes créés en surface ainsi que par les finis de surface et les additifs ajoutés aux matériaux. En effet, plus une surface sera dense, plus il sera difficile pour les atomes de diffuser à l'intérieur du volume. Comme le cuivre est plus dense que l'aluminium et le Pyrex, ce phénomène peut être une explication plausible pour l'observation d'un nombre plus grand d'atomes d'oxygène. Par ailleurs, plus les oxydes formés en surface ( $\text{CuO}$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , etc.) seront stables, plus grandes seront les pertes occasionnées par ces recombinaisons. Comme  $\text{CuO}$  est moins stable que l'alumine ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), lorsqu'une particule étrangère entre en collision avec cet oxyde, il se dissociera pour redonner un atome d'oxygène au volume, ce qui n'est pas le cas pour l'alumine qui est très stable.

### ***5.7 Perspectives : essais préliminaires sur des tubulures***

Des essais préliminaires sur des tubes en acier inoxydable furent effectués afin de vérifier les possibilités d'arriver à stériliser les cathéters utilisés en milieu hospitalier. Pour ce faire, des tubes de 15 et 30 cm furent utilisés ayant des diamètres internes de 3.6 et 4.5 mm.

Sur une charge d'environ 30 tubes (toutes les longueurs et tous les diamètres ensembles), deux tubes d'inox de 15 cm (un de 3.6 mm de diamètre et l'autre de 4.5) furent stérilisés (utilisation d'indicateurs biologiques commerciaux placés au centre des tubes) en 40 minutes avec le mélange optimisé 2%  $\text{O}_2 / \text{N}_2$ . Ces résultats laissent

présager un potentiel des plus intéressants pour le développement d'un procédé éventuellement commercialisable.

## ***CHAPITRE 6 – CONCLUSION GÉNÉRALE***

---

Ce travail sur la stérilisation par plasma en post-décharge s'insère dans la continuité des travaux de recherche ayant été effectués sur le sujet. De Menashi (1968) à notre groupe de recherche (1999), plusieurs phénomènes similaires ont été observés surtout en ce qui concerne l'utilisation de l'oxygène atomique en tant qu'agent stérilisant inhérent au plasma en décharge ou en post-décharge.

Par contre, la découverte de la contribution fondamentale du rayonnement ultraviolet de la post-décharge est exclusive à notre groupe. Cette trouvaille a donc permis d'optimiser le procédé tout en maintenant des températures de traitement très basses. De plus, ce travail a mis l'accent sur l'importance des paramètres opératoires de la décharge afin de contrôler l'efficacité du procédé. L'augmentation du débit de gaz tout en maintenant une basse pression afin de bien uniformiser la distribution des espèces actives dans tout le volume de traitement est propre au groupe de la Polytechnique et de l'Université de Montréal. Le respect d'une densité critique (toujours inconnue) ainsi que le choix judicieux du matériau constituant l'enceinte sont des facteurs à être considérés et étudiés plus en profondeur. Ce premier projet de recherche sur la stérilisation par plasma différé effectué au département de génie biomédical de l'École Polytechnique ouvre donc la voie à de nouvelles explorations et a permis de bien situer le GRBB (Groupe de Recherche en Biomécanique et Biomatériaux), le groupe de Physique des Plasmas et le laboratoire de microbiologie et d'immunologie de la Faculté de Médecine

Dentaire de l'Université de Montréal au niveau international justement à cause des innovations inhérentes à ce travail.

Par contre, il est important de préciser que ce travail possède certaines limites dont la principale est la non utilisation de matériels d'emballage pour les traitements de stérilisation. De plus, l'utilisation de différentes spores bactériennes aurait permis de vérifier la résistance de diverses espèces face au procédé de plasma en post-décharge.

La force de ce projet est d'avoir bien cerner le problème de la stérilisation par plasma et d'avoir utilisé une méthode spectroscopique afin de caractériser les espèces actives du plasma différé. Tout ceci mit ensemble a permis au groupe de jeter certaines bases opératoires des plasmas afin d'optimiser le temps de traitement pour obtenir une stérilisation complète des matériaux biomédicaux. Plusieurs voies peuvent donc être utilisées toujours dans le but de faire avancer la recherche dans ce domaine des plus prometteurs. En espérant que cet ouvrage devienne un outil de référence pour les futurs chercheurs voulant développer un tel procédé de stérilisation par plasma.

## ***BIBLIOGRAPHIE***

---

ABTOX (1993). Users Guide.

ADLER, S., SCHERRER, M. and DASCHNER, F.D. (1998). Costs of Low-Temperature Plasma Sterilization Compared with Other Sterilization Methods. Journal of Hospital Infection, 40, 125-134.

ALFA, M.J., DeGAGNE, P., OLSON, N. and PUCHALSKI, T. (1996). Comparison of Ion Plasma, Vaporized Hydrogen Peroxide, and 100% Ethylene Oxide Sterilizers to the 12/88 Ethylene Oxide Gas Sterilizer. Infection Control and Hospital Epidemiology, 17 : 2, 92-100.

ANDERSON, D.C. (1989). Gas Plasma Sterilization: Innovation in Practice. Navy Medicine, September – October.

ASHMAN, L.E. and MENASHI, W.P. (1972). Treatment of Surfaces with Low Pressure Plasmas. U.S. Pat. 3,701,628, October 31.

BAIER, R.E., CARTER, J.M., SORENSEN, S.E., MEYER, A.E., MCGOWAN, B.D. and KASPRZAK, S.A. (1992). Radiofrequency Gas Plasma (Glow Discharge) Disinfection of Dental Operative Instruments, Including Handpieces. Journal of Oral Implantology, 18 : 3, 236-242.

BAIER, R.E., CARTER, J.M., SORENSEN, S.E., MEYER, A.E., MCGOWAN, B.D. and KASPRZAK, S.A. (1992). Radiofrequency Gas Plasma (Glow Discharge) Disinfection of Dental Operative Instruments, Including Handpieces. Journal of Oral Implantology, 18 : 3, 236-242.

BEYSENS, D. and MARCOS MARTIN, M. (1995). Buée bactéricide. Pour la science, 210, 30.

BITHELL, R.M. (1982). Package and Sterilizing Process for Same. U.S. Pat. 4,321,232, March 23.

BORNEFF-LIPP, M., OKPARA, J., BODENDORF, M. and SONNTAG, H.G. (1997). Validation of Low-Temperature-Plasma (LTP) Sterilization Systems – Comparison of Two Technical Versions, the Sterrad™ 100, 1.8 and the 100 S. Hygiene and Microbiology, 3, 21-28.

BOUCHER, R.M.G. (1980). Seeded, Gas Plasma Sterilization Method. U.S. Pat. 4,207,286, June 10.

BOUCHER, R.M.G. (1985). State of the Art in Gas Plasma Sterilization. Medical Device & Diagnostic Industry, 7 : 51-56.

BURGESS, D.J. et REICH, R.R. (1993). Industrial ethylene oxide sterilization. Sterilization Technology : A practical guide for manufacturers and users of health care products, R.F. Morrissey & G. Briggs Phillips éd., Van Nostrand Reinhold, New York, 152-195.

CHAIGNEAU, M. (1977). Acide peracétique. Stérilisation et désinfection par les gaz, Maisonneuve, France, 169-171.

CHAIGNEAU, M. (1977). Béta-propiolactone. Stérilisation et désinfection par les gaz, Maisonneuve, France, 125-138.

CHAIGNEAU, M. (1977). Formaldéhyde. Stérilisation et désinfection par les gaz, Maisonneuve, France, 139-161.

CHAIGNEAU, M. (1977). L'oxyde d'éthylène. Stérilisation et désinfection par les gaz, Maisonneuve, France, 23-107.



CHAMBERLAIN, V.A. (1989). Sterility compliance issues. Sterilization in the 1990s, Health Manufacturers Association, Washington D.C., 115-128.

CHAU, T.T., KAO, K.C., BLANK, G. and MADRID, F. (1996). Microwave Plasmas for Low-Temperature Dry Sterilization, Biomaterials, 17, 1273-1277.

CROW, S. and SMITH, J.H. (1995). Gas Plasma Sterilization – Application of Space-Age Technology. Infection Control and Hospital Epidemiology, 16 : 8, 483-487.

CZERWIEC, T., GAVILLET, J., BELMONTE, T., MICHEL, H. et RICARD, A. (1996). Determination of N and O Atom Density in Ar-N<sub>2</sub>-H<sub>2</sub> and Ar-O<sub>2</sub>-H<sub>2</sub> Flowing Microwave Post Discharges, J. Phys. III, 6, 1205-1212.

DRICKS, A. (1999). The Bacterial Spore. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 63 : 1, 1-37.

FALKENSTEIN, Z. (1999). Effects of the O<sub>2</sub> Concentration on the Removal Efficiency of Volatile Organic Compounds with Dielectric Barrier Discharges in Ar and N<sub>2</sub>. Journal of Applied Physics, 85 : 1, 525-529.

GOGOLEWSKI, S., MAINIL-VARLET, P. and DILLON, J.G. (1996). Sterility, Mechanical Properties, and Molecular Stability of Polylactide Internal-Fixation Devices Treated with Low-Temperature Plasmas. Journal of Biomedical Materials Research, **32**, 227-235.

GROSS, P.M. et DIXON, L.F. (1933). U.S. Patent 2 075 845.

HERRING, C.M. et SAYLOR, M.C. (1993). Sterilization with radioisotopes. Sterilization Technology : A practical guide for manufacturers and users of health care products, R.F. Morrissey & G. Briggs Phillips éd., Van Nostrand Reinhold, New York, 196-217.

HÖLLER, C., MARTINY, H., CHRISTIANSEN, B., RÜDEN, H. and GUNDERMANN, K.O. (1993). The Efficacy of Low Temperature Plasma (LTP) Sterilization, a New Sterilization Technique. Zbl. Hyg., **194**, 380-391.

<http://www.fda.gov/bbs/topics/ANSWERS/ANS00860.html>.

HURY, S. (1997). Optimisation d'un procédé de stérilisation pour plasma froid. Rapport de Diplôme d'Études Approfondies (DEA), Université Joseph-Fourier (Grenoble).

HURY, S., VIDAL, D.R., DESOR, F., PELLETIER, J. and LAGARDE, T. (1998). A Parametric Study of the Destruction Efficiency of Bacillus spores in Low Pressure Oxygen-Based Plasmas, Letters in Applied Microbiology, 26, 417-421.

HURY, S., VIDAL, D.R., DESOR, F., PELLETIER, J. and LAGARDE, T. (1998). A Parametric Study of the Destruction Efficiency of Bacillus spores in Low Pressure Oxygen-Based Plasmas, Letters in Applied Microbiology, 26, 417-421.

JACOBS, P. and KOWATSCH, R. (1993). Sterrad<sup>®</sup> Sterilization System: A New Technology for Instrument Sterilization. Endoscopic Surgery, 1, 57-58.

JACOBS, P.T. and LIN, S.M. (1987). Hydrogen Peroxide Sterilization System. European Patent Application 207, 417, January 7.

KAYE, S. (1949). The sterilizing action of ethylene oxide. American Journal of Hygiene, 50, 289-295.

KELLY-WINTENBERG, K., MONTIE, T.C., BRICKMAN, C., ROTH, J.R., CARR, A.K., SORGE, K., WADSWORTH, L. and TSAI, P.P.Y. (1998). Room Temperature Sterilization of Surfaces and Fabrics with One Atmosphere Uniform Glow Discharge Plasma, Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 20, 69-74.

KELLY-WINTENBERG, K., MONTIE, T.C., BRICKMAN, C., ROTH, J.R., CARR, A.K., SORGE, K., WADSWORTH, L. and TSAI, P.P.Y. (1998). Room Temperature Sterilization of Surfaces and Fabrics with One Atmosphere Uniform Glow Discharge Plasma, Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 20, 69-74.

KHOMICH, A.V., SOLOSHENKO, I.A., TSIOLKO, V.V. and MIKHNO, I.L. (1997). Proceedings of the 12<sup>th</sup> International Conference on Gas Discharges & Their Applications, Greifswald, Germany.

KREBS, M.C., BÉCASSE, P., VERJAT, D. and DARBORD, J.C. (1998). Gas – Plasma Sterilization : Relative Efficacy of the Hydrogen Peroxide Phase Compared With That of the Plasma Phase. International Journal of Pharmaceutics, 160, 75-81.

KYI, M.S., HOLTON, J. and RIDGWAY, G.L. (1995). Assessment of the Efficacy of a Low Temperature Hydrogen Peroxide Gas Plasma Sterilization System. Journal of Hospital Infection, 31, 275-284.

LEROUGE, S., WERTHEIMER, M. R., MARCHAND, R., TABRIZIAN, M., YAHIA, L'H. (1999). Effect of Gas Composition on Spore Mortality and Etching during Low-Pressure Plasma Sterilization. J. Biomed. Mater. Res., (in press)

LEROUGE, S., FOZZA, A. C., WERTHEIMER, M. R., MARCHAND, R., TABRIZIAN, M., YAHIA, L'H. (1999). Plasma Sterilization : Spore Destruction by Microwave Plasmas. M.R.S. meeting (in press)

LEROUGE, S., GUIGNOT, C., YAGOUBI, N., FERRIER, D., TABRIZIAN, M., YAHIA, L'H. (1999). Surface and Bulk Modification Induced by Gaz Plasma Sterilization on Electrophysiology Catheters. Proceed. of the 25<sup>th</sup> Annual Meeting Transactions, Society for Biomaterials, p.195

LEROUGE, S., TABRIZIAN, M., MOREAU, S., WERTHEIMER, M.R., MARCHAND, R., YAHIA, L'H. (1998). Reuse of Catheters : Surface Modification Induced by Gaz Plasma and Pure Ethylene Oxide Sterilization. Proceed. of the 24<sup>th</sup> Annual Meeting Transactions, Society for Biomaterials, p.195

MARTENS, P.A. and RAINWATER, D.L. (1998). Plasma Water Vapor Sterilizer Apparatus. U.S. Patent 5,753,196, May 19.

MAUGH II, T. (1973). Singlet Oxygen : A Unique Microbicidal Agent in Cells. Science, 182, 44-45.

MENASHI, W.P. (1968). Treatment of Surfaces. U.S. Pat. 3,383,163, May 14.

MÉREL, P., TABBAL, M., MOISAN, M. and RICARD, A. (1998). Plasma Sources, Science & Technologies, 7, 550-556.

MOISAN, M. (1996). Notes de cours. Introduction à la physique des plasmas, Université de Montréal.

MOISAN, M. and ZAKRZEWSKI, Z. (1992). Microwave Excited Discharges, edited by M. Moisan and J. Pelletier (Elsevier, Amsterdam, 1992), chap. 5.

MOISAN, M., MOREAU, S., TABRIZIAN, M., PELLETIER, J., BARBEAU, J., and Yahia, L'H. (1999). Canadian Patent Application, serial number 2 273 432.

MOISAN, M., CHAKER, M., ZAKRZEWSKI, Z. and PARASZCZAK, J. (1987). Journal of Physics E : Scientific Instrumentation, 20, 1356-1361.

MOISAN, M., LEPRINCE, P., BEAUDRY, C. and BLOYET, E. (1977). U.S. Patent 4,049,940.

MOISAN, M., ZAKRZEWSKI, Z. and PANTEL, R. (1979). Journal of Physics D : Applied Physics, 12, 219-237.

MOREAU, S., MOISAN, M., TABRIZIAN, T., BARBEAU, J. and YAHIA, L'H. (2000). Gas Plasma Sterilization : Past, Present and Future. Submitted to American Journal of Infection Control.

MOREAU, S., TABRIZIAN, M., BARBEAU, J., MOISAN, M. et YAHIA L'H. (1999). Gas plasma sterilization : reality vs. myth. Journal of Hospital Infection. Soumis.

MOREAU, S., TABRIZIAN, M., BARBEAU, J., MOISAN, M., LEDUC, A., PELLETIER, J., LAGARDE, T., ROHR, M., DESOR, F., VIDAL, D., RICARD, A. and YAHIA, L'H. (1999). Optimum Operating Conditions Leading to Complete Sterilization at Low Substrate Temperatures in a Plasma Flowing Afterglow. Proceedings of the 12<sup>th</sup> International Colloquium on Plasma Processes : Le Vide : science, technique et applications, supp. 291, 46-50, Antibes, France.

MOREAU, S., TABRIZIAN, M., BARBEAU, J., MOISAN, M., LEDUC, A., PELLETIER, J., LAGARDE, T., ROHR, M., DESOR, F., VIDAL, D., RICARD, A. and YAHIA, L'H. (1999). Essential Parameters for Plasma Sterilization. Proceedings of the 19<sup>th</sup> International Conference on Phenomena in Ionized Gases, Warsaw, Poland.

MOREAU, S., TABRIZIAN, M., MOISAN, M., BARBEAU, J. and YAHIA, L'H. (1999). The Role of Atomic Oxygen and UV Emission in Gas Plasma Afterglow Sterilization. 19<sup>th</sup> Annual Meeting of the Canadian Society For Biomaterials, Québec, June.

MOREAU, S., TABRIZIAN, M., MOISAN, M., BARBEAU, J. and YAHIA, L'H. (1998). Effects of Gas Plasma Parameters on the Bacterial Spores Destruction Rate. 18<sup>th</sup> Annual Meeting of the Biomedical Engineering Society, Cleveland, October.

MOREAU, S., TABRIZIAN, M., MOISAN, M., BARBEAU, J. and YAHIA, L'H. (1999). Study of the Influence of Gas Plasma Afterglow Operating Conditions on the Efficacy of Destruction of *Bacillus subtilis* Spores, Submitted.

NELSON, C.L. and BERGER, T.J. (1989). Inactivation of Micro-organisms by Oxygen Gas Plasma. Current Microbiology, 18, 275-276.

PEEPLES, R.E. and ANDERSON, N.R. (1985). Microwave Coupled Plasma Sterilization and Depyrogenation I. Mechanisms of Action. Journal of Parenteral Science and Technology, 39 : 1, 2-8.

PEEPLES, R.E. and ANDERSON, N.R. (1985). Microwave Coupled Plasma Sterilization and Depyrogenation II. Mechanisms of Action. Journal of Parenteral Science and Technology, 39 : 1, 9-14.



PELLETIER, J. (1993). La Stérilisation par le Procédé Plasma. Agressologie, **33** : **2**, 105-110.

PONCIN-ÉPAILLARD, F., BROSSE, J.C. et FALHER, T. (1997). Postgrafting of N-vinyl-2-pyrrolidone onto a plasma modified polypropylene surface. Macromol. Chem. Phys., **199** : **8**, 1613-1621.

PRESCOTT, L., HARLEY, J.P. et KLEIN, D.A. (1995). Glossaire. Microbiologie, DeBoeck-Université, Bruxelles, 955-981.

PRESCOTT, L., HARLEY, J.P. et KLEIN, D.A. (1995). Le contrôle des micro-organismes par les agents physiques et chimiques. Microbiologie, DeBoeck-Université, Bruxelles, 310-324.

RICARD, A. (1995). Chimiluminescence, Plasmas Réactifs. Société Française du Vide, Paris, 102-104.

RUSSELL, A.D. (1993). Theoretical Aspects of Microbial Inactivation. Sterilization Technology : A practical guide for manufacturers and users of health care products, R.F. Morrissey & G. Briggs Phillips éd., Van Nostrand Reinhold, New York, 120-151.

SCHUMB, W.C., SATTERFIELD, C.N. et WENTWORTH, R.L. (1955). Hydrogen peroxide, New York, Reinhold.

SINTIM-DAMOA, K. (1993). Other gaseous sterilization methods. Sterilization Technology : A practical guide for manufacturers and users of health care products, R.F. Morrissey & G. Briggs Phillips éd., Van Nostrand Reinhold, New York, 335-347.

VASSAL, S., FAVENNEC, L., BALLEST, J.J. and BRASSEUR, P. (1998). Hydrogen Peroxide Gas Plasma Sterilization is Effective Against *Cryptosporidium parvum* oocysts. American Journal of Infection Control, 26 : 2, 136-138.

VICKERY, K., DEVA, A.K., ZOU, J., KUMARADEVA, P., BISSETT, L. and COSSART, Y.E. (1999). Inactivation of Duck Hepatitis B Virus by a Hydrogen Peroxide Gas Plasma Sterilization System : Laboratory "in use" Testing. Journal of Hospital Infection, 41, 317-322.

VIDAL, D. et PELLETIER, J. (1996). Optimisation du procédé de stérilisation plasma, répondant au besoin des formations sanitaires de campagne. Rapport de fin de contrat, commande etas n°565/5034. Unité de Microbiologie, Centre de Recherche des Services de Santé de l'Armée (CRSSA).

WOOD, R.T. (1993). Sterilization with dry heat. Sterilization Technology : A practical guide for manufacturers and users of health care products, R.F. Morrissey & G. Briggs Phillips éd., Van Nostrand Reinhold, New York, 81-119.

WURTZ, A. (1859). Ann. Chim. Phys. (3), 53, 418-433.

YOUNG, J.H. (1993). Sterilization with steam under pressure. Sterilization Technology : A practical guide for manufacturers and users of health care products, R.F. Morrissey & G. Briggs Phillips éd., Van Nostrand Reinhold, New York, 120-151.